

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-309836

(43) 公開日 平成7年(1995)11月28日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 D 213/26

213/30

213/48

213/54

213/73

審査請求 有 発明の数11 書面 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-251174
(62) 分割の表示 特願昭62-503860の分割
(22) 出願日 昭和62年(1987)4月30日

(31) 優先権主張番号 8 5 8 3 5 4
(32) 優先日 1986年4月30日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 593006353
イゲン, インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 20852 メリーランド州,
ロックビル, イースト ジェファークソン
ストリート 1530
(72) 発明者 マッセイ, リチャード ジェイ,
アメリカ合衆国 20852 メリーランド州
ロックビル, グロスベノー プレース
10201
(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エレクトロ化学ルミネセンスアッセイ

(57) 【要約】

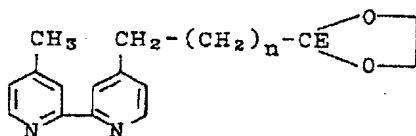
【目的】 エレクトロ化学ルミネセンス標識物及びそれを用いた検定法。

【構成】 電気化学的エネルギーを受けた時に電磁放射線を放出するような試薬を目的分析物と結合させて、次いで電気化学的エネルギーを与えてそこから放出される電磁放射線を検出して、それによって目的分析物を検定する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 nが整数である下の式の構造の化合物。

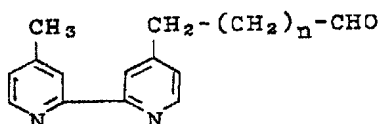
【化1】



【請求項2】 nが2である、請求項1の化合物。

【請求項3】 nが整数である、下の式の構造の化合物。

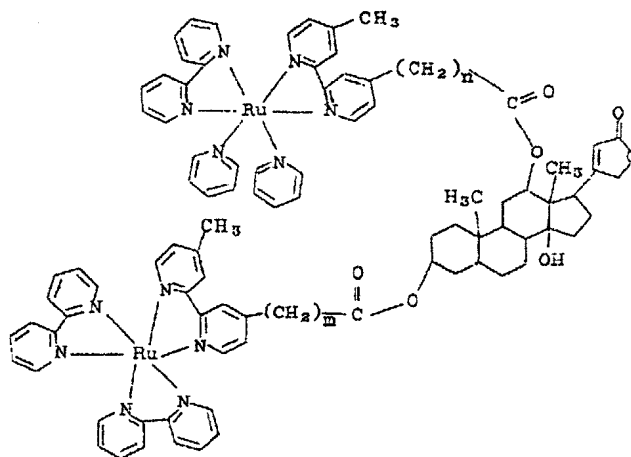
【化2】



【請求項4】 nが2である、請求項3の化合物。

【請求項5】 nが整数である、下の式の構造の化合物。

* 20 【化5】

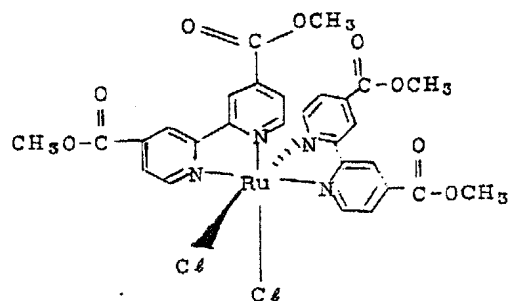


【請求項10】 mとnの両者が3である、請求項9の化合物。

【請求項11】 下の式の構造の化合物。

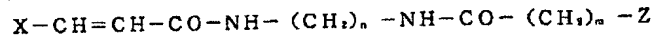
【化6】

40



【請求項12】 Xが同一または異った1ケまたはそれ以上のスクレオタイドを示しZがエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種を示しnが1または1より大きい

整数を示し、およびmが1または1より大きい整数を示している下の式の構造の合成物。 * 【化7】

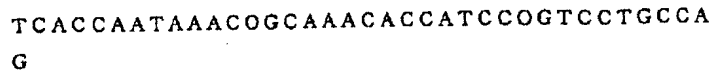


【請求項13】 Xが第5位の炭素原子のCHに結合しているチミジンで、nが7でmが3である、請求項12の合成物。 ※成物。

【請求項14】 Zがビス(2, 2'-ビビリジン[4-(ブタン-1-アル)-4'-メチル-2, 2'ビビリジン]ルテニウム(II)である、請求項12の合※

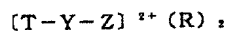
【請求項15】 チミジンヌクレオタイドが下の式のヌクレオタイドシーケンスに結合した3'末端ヌクレオタイドである、請求項14の合成物。

【化8】



【請求項16】 Tがテオフィリンを示し、YがTとZに結合したリンカーグループを示し、nが1または1より大きい整数を示し、およびmが1または1より大きい整数を示している、下の式の構造の合成物。

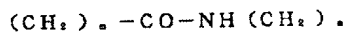
【化9】



【請求項17】 YがTの第8位の炭素に結合している、請求項16の合成物。 20

【請求項18】 Yが下の式の構造で、mおよびnが同一または異なる、1または1より大きい整数で示す請求項17の合成物。

【化10】

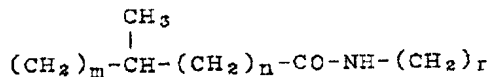


【請求項19】 mが3で、nが4である請求項18の合成物。

【請求項20】 mおよびnが両者3である、請求項18の合成物。 30

【請求項21】 Yが下の式の構造をもち、m、nおよびrが同一または異なる、1または1より大きい整数を示す、請求項17の合成物。

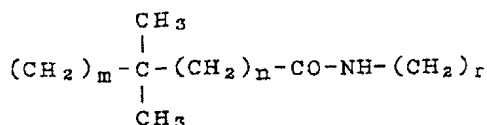
【化11】



【請求項22】 mが1、nが1であり、rが4である請求項21の合成物。

【請求項23】 Yが下の式の構造をもち、m、nおよびrが同一または異なる、1または1より大きい整数である、請求項17の合成物。 40

【化12】

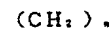


【請求項24】 mが1、nが1であり、rが4である、請求項23の合成物。

【請求項25】 YがTの7位のちっ素に結合している、請求項16の合成物。

【請求項26】 Yが下の式の構造をもち、nが1または1より大きい整数である、請求項25の合成物。

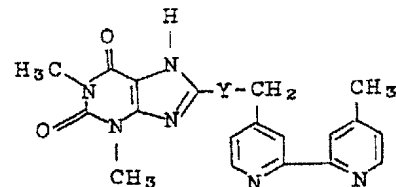
【化13】



【請求項27】 nが4である請求項26の合成物。

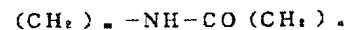
【請求項28】 Yがリンカーアームである下の式の構造である化合物。

【化14】



【請求項29】 Yが下の式の構造をもち、mおよびnが同一または異なり、1または1より大きい整数である、請求項28の化合物。

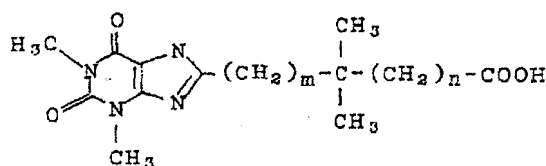
【化15】



【請求項30】 mが3で、nが2である、請求項29の化合物。

【請求項31】 下の式の構造をもち、mおよびnが同一または異なる整数である化合物。

【化16】



【請求項32】 mおよびnが共に1である、請求項31の化合物。

【請求項33】 下の式の構造をもち、Xが同一または【化17】



異なる1ヶまたはそれ以上のアミノ酸を示し少くとも1ヶのシステインまたはメチオニンを含む、ZがシステインまたはメチオニンのS置換基にマレイミドの第3または第4位の炭素原子で結合しているビス(2, 2'-ビピリジン)マレイミドヘキサン酸、4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-エチルアミドルテニウム(II)である合成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本出願に関する刊行物はカッコ内にアラビア数字で示す。これらの参考文献の引用一覧は請求の範囲のすぐ前の発明明細書の最後に挙げてある。これらの刊行物に関する完全な説明を記載するのは、それによって本発明に関連する技術状況をより完全に説明できるように本出願に参考文献を引用しているためである。化学的、生化学的、生物学的物質を検出し定量するための速やかかつ高度に特異的な方法が常に必要とされ需要が拡大している。特に少量の医薬品、代謝産物、微生物やその他の診断上価値のある材料を測定するための方法は重要である。このような材料の例としては麻薬及び毒薬、治療上の目的で投与される薬物、ホルモン、病原性をもつ微生物及びウイルス、抗体、代謝産物、酵素や核酸等が挙げられる。

【0002】

【従来の技術】 このような材料の存在は高度な特異性をもつ結合法を用いて検出されることが多く、これによって多くの生化学及び生物学的系の特徴が明らかになっている。頻繁に使用されている方法の例としては、抗原-抗体系、核酸ハイブリッド形成法、たん白質-リガンド系等がある。このような方法においては通常複雑な材料の1つあるいはそれ以上に目印としてつけた検出可能な「標識」の有無によって診断上有用な複合体の存在が明らかになっている。選択した特異的標識方法によって当該材料の検出のための特別な系の有用性及び融通性が決まることが多い。好ましい標識物の条件としては安価であり安全であって、多岐にわたる化学的、生化学的、生物学的材料の重要な結合特性を変化させることなく効率よくそれらの材料に標識できることが必要である。標識物は高度に特徴的な目印をもっていなければならない、

さらに天然にはほとんど、あるいはより好ましくは全く存在していないことが必要である。標識物は安定であり何か月にもわたる期間を経て水溶液系中で検出可能であることが要求される。検出の際には高価な特別の設備や技術者を必要とせず、速やかに、かつ高い感度、及び再現性をもって標識物が検出されなければならない。標識物の定量に当たっては、温度や供試混合物の組成といった変化要素に比較的影響されにくいことが必要である。均一系、すなわち標識材料の複合体及び非複合体を分離する必要のない系において使用できる標識物が最も有用である。標識された材料が特定の複合体中に取り込まれた時に標識物の検出度を調節するようにすればこれが可能である。

【0003】 非常に多くの種類の標識物が開発されており、それぞれ長所、短所をもっている。例えば放射性標識物はきわめて多用途に使用でき、非常に低い濃度においても検出可能である。しかし高価で危険性もあり、その使用のためには精巧な装置と訓練を受けた技術者が必要である。さらに放射性標識物の感度は、標識された材料において検出し得る事象というのがその本質上放射性原子当たり1回しか起こらないという事実によって限定されてしまう。また放射性標識物は均質法においては使用できない。

【0004】 このため非放射性の標識物に高い関心が集まっている。例えば分光測光、スピン共鳴、ルミネセンス法によって検出可能な分子や、そのような分子を産生し得る酵素等がそれに含まれる。有用な非放射性標識材料の中に有機金属化合物がある。ある種の金属は生物学的系においてまれにしか存在しないため、有機金属化合物中の金属成分を特異的に試験する方法が有効となる。例えばCa⁴⁵、アメリカ特許番号4, 205, 952 (1980年)は、特異的抗原を定量するのにある種の有機金属化合物によって標識された免疫化学的活性材料を使用している。このような標識物に対しては選択した金属を検出するのに発光、吸収、蛍光分光法、原子吸光、中性子活性化等を含む一般的手法がどれでも使用できる。これらの方法は感度が低いという欠点をもつことが多く、均質系にはほとんど適用できない。また原子吸光に関しては時として試料の破壊を伴う。光化学的、化学的、電気化学的手段を通じて発光するように作られた標識物は特に興味深い。「光化学ルミネセンス」とは材料が電磁放射線を吸収した時に発光するように作られた過程である。蛍光及びりん光は光化学ルミネセンスの一種である。「化学ルミネセンス」過程にはエネルギーの

化学的変換による発光物の産生が伴っている。「エレクトロ化学ルミネセンス」には電気化学的に産生される発光物が伴う。

【0005】このような発光系の重要性は増加している。例えばNandle、アメリカ特許番号4,372,745(1983年)は免疫化学的应用分野において化学ルミネセンス標識物を使用している。この系では標識物が H_2O_2 とシュウ酸塩と反応することによる化学的手段によって標識物を発光状態に励起させている。この系では H_2O_2 がシュウ酸塩を酸化して高エネルギー誘導体に転換しその結果標識物を励起させるのである。この系は原理的には、試験における酸化条件下で安定であり高エネルギーシュウ酸塩誘導体によって励起され得る発光物質であればどんな材料でも使用できる。残念なことにこのようにきわめて融通性の高いことが技術の限界の主な要因となってしまう。当該分析物を含む生物学的溶液は一般に発光の可能性をもつ物質も大量に含んでおり、ルミネセンスのバックグラウンド値を高くする原因となる。

【0006】化学ルミネセンスの免疫化学的利用法でやはり同様の欠点をもつもう1つの例は、Oberhardtら、アメリカ特許番号4,280,815(1981年)によるもので、化学ルミネセンスによって標識された免疫反応物質と非常によく類似しているin situにおける酸化剤(例えば H_2O_2)の電気化学的産生に関して述べている。電気的に産生されたオキシダントが化学ルミネセンス物質中に拡散しそれを化学的に酸化することによって1つ以上の電子を電気的に産生されたオキシダントに転移させる。化学ルミネセンス物質は酸化される際に光子を放つ。これに対し本発明の対象物では、電気化学的エネルギー源から化学ルミネセンス物質への直接の電子転移が必要であり、このため光子の連続放出が可能となる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明はエレクトロ化学ルミネセンス標識物に関するものである。適切な標識物としては有機化合物及び有機金属化合物を含むエレクトロ化学ルミネセンス化合物から成るものを用いる。多くの理由から、標識された材料の存在を検出する方法としては他の方法よりもエレクトロ化学ルミネセンス法の方が適している。特定の標識物の存在を高度に判定でき、感度が高く、危険性が少なく、安価であり、さらに応用範囲も広い。電気化学的標識物として適切な有機化合物には例えばルブレンや9,10-ジフェニルアントラセン等がある。有機金属化合物の多くが電気化学的標識物として適しているが、特にルテニウム及びオスミウム含有化合物は有用である。

【0008】このため1つの具体例として本発明では多岐にわたる方法を用いて検出可能なルテニウム及びオスミウム含有標識物の使用について述べている。これらの

標識物は以下の文中で論ずるように数多くの点で有益なものである。ルテニウム及びオスミウム含有有機金属化合物については文献中でも論じられている。Caisはルテニウムのような第8群の貴金属を含む金属元素あるいはそのような金属元素の組み合わせであればどれも原子吸光法によって検出可能な有機金属標識物の成分として適切であると述べている(Cais, 11列20行)。しかしCaisの文献においてはルテニウムは適切な金属とされておらずオスミウムに関しては特に言及されておらず、記載されたどの方法にもルテニウムまたはオスミウムを使用した場合の有効性に関するデータは含まれていないし、適切な方法とされている原子吸光法には試料の破壊が伴っている。

【0009】Weber、アメリカ特許番号4,293,310(1981年)はイムノアッセイにおける分析物の電気化学的標識物としてルテニウム及びオスミウム含有複合体を使用することに関する報告をしている。この複合体は分析物のチオ尿素結合を通じてアミノ基に結合している。Weberはまた他の分析物の水酸基と標識物との間にカルボキシルエステルを形成し得る可能性もあると述べている。Weberによると標識された材料の存在は、消光物質と光学手段を用いた電気化学的フローセルから成る器具、方法で検出できるとのことである。光電気化学的に活性な標識物が励起すると、電子を消光物質分子に転移させる。酸化された分子は続いて適当な電位に保ったフローセルの電極からの電子によって還元される。この電子を光電子流として測定するのである。系中の遊離標識分析物は光電子流信号によって測定する。この方法は発光材料のエレクトロ化学ルミネセンス検出の逆であることに留意すべきである。

【0010】Weberらはその後の報告で、ルテニウム含有標識物を検出するためにこの方法を用いる際の問題点について論じている(1)。Weberら(1)の表2によると、トリス(ピピリジル)ルテニウム(I)の外挿検出限界は最適条件下で 1.1×10^{-10} モル/1となっている。これらの標識物を実際に使用する際には複合体混合物の存在下で測定することになるであろうと予想し、Weberらはその系において考えられる妨害物について調査した。Weberらの表3ではジメチルアルキルアミン類、EDTA、N-メチルモルホリン、N,N'-ジメチルピペラジン、水酸化物、シュウ酸塩、アスコルビン酸塩、尿酸、血清等が、実際の検出限界を 1.1×10^{-10} モル/1以上に引き上げると考えられる妨害物として挙げられている。これらの研究は単純なルテニウム含有化合物を用いて行なわれている。ルテニウム含有標識物によって標識した複合体の検出限界に関して、またこの試験条件下において標識された材料と標識物との間のチオ尿素結合が安定であるかどうかについての記述はWeber、あるいはWeberらの報告中にはされていない。50

【0011】本発明における標識物はエレクトロ化学ルミネセンスに関するものである。この標識物は電磁放射線や、シュウ酸塩-H₂O₂のような代表的系により產生される化学エネルギー源に接触することで酸化あるいは還元されなくても、発光状態にまで励起し得ることが多い。さらに酸化、還元を伴う電気化学的方法によってもこれらの化合物の発光を起こすことができる。光化学ルミネセンス、化学ルミネセンス、エレクトロ化学ルミネセンスの手段を用いてルテニウム(2, 2'-ビピリジン)₃²⁺を検出する方法についての詳細な研究が報告されている(2, 3)。この研究ではシュウ酸イオンまたは他の有機酸の酸化の中間体として產生された強い還元剤と共に化学的あるいは電気的に生成されるルテニウム(bpy)₃³⁺(「bpy」はビピリジルリガンドのこと)の水性反応によって明るいオレンジ色の化学ルミネセンスが得られると述べている。また過酸化二硫酸の還元に伴い產生された強い還元剤と共に電気的あるいは化学的に生成されるルテニウム(bpy)₃¹⁺の反応によって、有機溶剤-水溶液中でルミネセンスを得ることも可能である。ルテニウム(bpy)₃²⁺からエレクトロ化学ルミネセンスを得るための3番目の機構としては、電極の電位をルテニウム(bpy)₃¹⁺を產生するのに十分なマイナス電位とルテニウム(bpy)₃³⁺を產生するのに十分なプラス電位との間で振動させるという方法がある。以上の3種類の方法はそれぞれ「酸化還元」、「還元酸化」、「ルテニウム(bpy)₃³⁺/+再生系」と呼ばれている。

【0012】酸化還元法は水中で行うことができ、強く、有効で、安定なルミネセンスが得られ、酸素や不純物の存在に対しては比較的感受性が低い。このルテニウム(bpy)₃²⁺からのルミネセンスは、シュウ酸塩やその他ピルビン酸塩、乳酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩等の有機酸、そしてルテニウム(bpy)₃³⁺を酸化的に生成し得る手段が存在する場合に得られる。この酸化はPbO₂やセリウム(IV)塩のような強い酸化剤によって化学的に起こすことができる。また連続的あるいは間欠的に十分にプラスである電位をかけることによって電気化学的に起こすこともできる。ルテニウム(bpy)₃²⁺を電気化学的に酸化させるのに適当な電極としては、例えばプラチナ、熱分解性グラファイト、ガラスカーボン等がある。シュウ酸塩やその他の有機酸は化学ルミネセンスを出す過程で消費されてゆくが、このように消費されてしまう材料を過剰に添加しておくか、反応チャンパー中に連続的に供給するかによって強く一定した化学ルミネセンスを何時間にもわたって得ることができる。

【0013】還元酸化法は例えばアセトニトリルのような有機共溶剤を含む部分水性溶液で行うことができる。このルミネセンスは、過酸化二硫酸と、ルテニウム(bpy)₃¹⁺を還元的に生成し得る手段とが存在す

る場合に得られる。この還元は例えばマグネシウムや他の金属のような強い還元剤によって化学的に起こすことができる。また連続的あるいは間欠的に十分にマイナスである電位をかけることによって電気化学的に起こすこともできる。ルテニウム(bpy)₃²⁺を電気化学的に還元させるのに適当な電極としては、例えば光沢ガラスカーボンがある。酸化還元法の場合と同様、試薬を過剰に添加しておくか、反応液中に消費された試薬を連続的に供給するかによって連続的な強いルミネセンスを何時間にもわたって得ることができる。

【0014】ルテニウム(bpy)₃³⁺/+再生系はアセトニトリルのような有機溶剤中、または部分水性溶液中で、電極の電位をルテニウム(bpy)₃²⁺を還元するのに十分なマイナス電位とルテニウム(bpy)₃²⁺を酸化するのに十分なプラス電位の間で振動させることによって行うことができる。このような再生系に適当な電極としては、例えばプラチナ電極がある。この系では化学試薬が消費されず、原理的には無限に続行することが可能である。以上の3種類のルテニウム含有化合物のルミネセンスを產生させる方法では、ルテニウム含有化合物の反復酸化還元あるいは還元酸化というのが共通点である。このためこれらの化合物を含む溶液のルミネセンスは、与えられたエネルギー源の電気的ポテンシャルに強く依存しており、そのためにルテニウム含有化合物の存在を高感度で検出できることになる。

【0015】MandleはCurtisらの報告(4)を、化学ルミネセンスの応用として使用可能な標識物として引用している。Curtisらは未発表データとしてではあるがルテニウム複合体はシュウ酸塩/H₂O₂系によって化学的に励起されると発光するようになると報告している(Curtisらp. 350) MandleもCurtisもルテニウム及びオスミウム複合体が化学ルミネセンスの応用分野として有用であることは認識していない。Sprintschnik, Gら

(5)はオクタデカノールまたはデヒドロコレステロールを用いてエステル化したトリス(2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)について報告し、これらの界面活性剤複合体の単層フィルムを產生した。この複合体は光学ルミネセンスを発する。しかしフィルムを水につけるとその後光に当たると、ルテニウム複合体は光学ルミネセンスを発しなくなる。これは光の存在下でエステル基の光学的加水分解が起きるためである。アミド結合またはアミン結合を通して多岐にわたる分析当該物及び分析当該物に結合する化学種に対しルテニウム含有あるいはオスミウム含有標識物を容易に標識し得る方法を開発したので以下に報告する。このようにして標識された材料は非常に多くの手段を用いて分析できるが、その中でも最も効率的で信頼性があり感度も高い方法は光学ルミネセンス、化学ルミネセンス、エレクトロ化学ルミネセンス

を用いる方法である。またルテニウム含有及びオスミウム含有標識物のようなエレクトロ化学ルミネセンス標識物、ルブレン及び9, 10-ジフェニルアントラセンのような有機分子が特に多用途に使用でき有効であることについても以下に述べる。このような新規標識材料を使用すること、そしてそれらを検出する方法についての大きな利点に関しても以下でさらに詳しく論じる。

【0016】食品会社は長年にわたり生の食品成分及び加工食品中の生物学的、化学的汚染物質の存在について関心をもってきている。技術進歩によって食品中の汚染物質混入及びその結果起こる食品起因の病気の発生は減少しつつあるが、その一方食品汚染物質の検出及び同定のための迅速で感度の高い方法の開発における進歩はほとんど見られていない。食品中の有害な汚染物質を検出するための既存の標準的方法は一般に非常に時間がかかり、労力も必要で、技術的にも困難である。分析方法自体は適度の感受性をもつものが大部分であっても、検出を行う前の試料調製過程が長くかかるために当該汚染物質の回収率が低くなってしまうことも多く、陰性であるとの誤判断が下されることもしばしばある。このような問題点の例となるのは、*Salmonella*及び*Staphylococcus*のエンテロトキシンが食品中に存在するかどうかを検出するのに現在用いられている標準的方法の2例である。食品中の*Salmonella*を検出する際には、これらの細菌が食品中に存在するとしても通常少数しか生息しておらず致死寸前の損傷を受けていることも多いため、いくつかの濃縮段階が含まれている。このため*Salmonella*の検出方法は感度が高く、損傷を受けた細胞を蘇生させ増殖させるようなものでなくてはならない。

【0017】現在*Salmonella*の検出方法としてはアメリカ食品医薬品局によって2種類が推奨されている。これらの方法はBacteriological Analytical Manual for Foods (1984年) 第6版、Association of official Analytical Chemists, Washington, DC. に記載されている。このうち一法は前濃縮、選択的濃縮、選択的プレーティングを含む純粋培養技法であり、推定結果を得るのに4日間、完全な結果を得るのに5~7日間を要する。もう一法は選択的濃縮の後、免疫蛍光検査法を用いるものである。この方法はより迅速であるが、試験に使用する多価の抗血清が交差反応性をもつという問題点があるため、陽性であるとの誤判断が下されることが高率で起こり得る(6, 7)。食品中の*Staphylococcus*エンテロトキシンを検出する方法としてアメリカ食品医薬品局が推奨している方法もBacteriological Analytical Manual for Foods (1984年) 第6版、Association of official Anal

ytical Chemists, Washington, DC. に記載されている。この方法では大量の食品試料、例えば約100gのものの抽出物を透析濃縮の数段階を経て約0.2ml程度の少量に濃縮し、マイクロスライド二重免疫拡散法の試料として調製するために試料抽出物をイオン交換カラムによって精製する。この方法を行うためには通常一週間以上を要する。

【0018】食品中の細菌、毒素、抗生物質、農薬のような各種の汚染物質を検出するより迅速な試験方法が最近開発されている。しかし多くの場合試験を実施する前の試料調製に依然として労力と時間を要する。ラジオイムノアッセイ(RIA)及び酵素標識イムノソルベントアッセイ(ELISA)によって分析方法自体の実施時間は短縮されたが、それでもこのような方法はやはり労力を要するもので、簡単に実施できるとはいえない。さらにこれらの方法は通常特異性も感受性も様々な多価の抗血清を使用することに基づいており、当該食品汚染物質の試験のためには量的に不足していることが多い。ELISA法は多価の抗血清ではなくモノクローナル抗体を用いて食品試料を分析するために開発された方法である。食品汚染物質の試験系にモノクローナル抗体を使用することによって試薬の一定した供給が得られるようになり、試験自体の不変の特異性、感度が保証される。ELISA系では*Salmonella*(8)や*Staphylococcus*のエンテロトキシン(9)のような食品汚染物質を試験するのにモノクローナル抗体が用いられている。EIA法(Bio-Enzabead Screen Kit, Litton Bionetics)及びDNAプローブ技法(Gene-Trak, Integrated Genetics)を用いる市販の*Salmonella*検出用製品は、時間がかかるし労力も要する。逆受身ラテックス凝集反応(SET-RPLA, Denka Seiken Co.)及びEIA法(SET-EIA, Dr. W. Bommeli Laboratories)を用いる市販の食品中*Staphylococcus*エンテロトキシン検出用製品も同様の欠点をもっている。水質及び汚水汚染の発生を管理するための指標として過去100年の間細菌*Escherichia coli*及び大腸菌型群が広く使用されてきた。

【0019】現在*E. coli*及び/または大腸菌型群の検出に使用されている方法は、乳糖の発酵による酸または気体産生の特性に基づいている。最も広く使われている方法は、最大可能菌数(MPN)試験と膜ろ過(MF)試験である。両方法共上水及び下水の微生物学的検査法として環境保護庁(EPA)及びアメリカ公衆衛生協会(APHA)により承認されており(10)、牛乳及び食品の微生物学的検査法として食品医薬品局(FDA)によっても承認されている。(11)。MPN法は実際には3種の(12)別個の試験から成っている(1

0)。推定試験においてはラウリル硫酸トリプトース (LST) ブロスや乳糖ブロスのような非選択的培地を用いて、乳糖発酵による気体産生を調べる。次に気体発生陽性であった試験管についてより選択的な培地中で継代培養を行う。大腸菌型群の培養にはブリリアントグリーン乳糖胆汁酸 (BGLB) ブロスを、糞便大腸菌型群の培養には *E. coli* (EC) ブロスを使用し、気体産生について再び調査する (確認試験)。確認試験で陽性を呈した試料はさらにエオシンメチレンブルー (EMB) 寒天培地や遠藤寒天培地のような選択的鑑別培地にプレーティングし、指標細菌の存在を明確に証明するためにグラム染色やその他の生化学的試験を行う (完全試験)。MPN試験を完全に終結するには最大5日間

(5) 必要なので、ほとんどの研究所では日常的水分析としてはMPN試験のうちの推定試験と確認試験のみを採用しているが、それでも終了までに48~72時間を要する。MPN試験は時間がかかり材料の面からも費用がかかるばかりでなく、陽性及び陰性であるとの誤判断が発生することが多い (15, 16, 20)。

【0020】水の微生物学的検査法としてMF法が導入されたのは1950年代の初期である (12)。冗長で時間のかかるMPN試験とは異なり、MF分析は24時間で完結しさらに確認する必要もない。MF法の基本手順は次の通りである。水試料の一定量、通常100mlを0.45μm孔径のろ紙を通じてろ過し、選択的培地で満たした滅菌パッド上で培養する。最もよく使用される培地は35℃で大腸菌型に選択的なm遠藤ブロスと44.5℃で糞便大腸菌型に選択的なmFCブロスの2種類である (10)。これらの培地が使用されるようになって以来、多くの著者らがm遠藤及びmFCブロスは共に実際に存在する指標細菌数よりも少なく算定する傾向にあると報告してきた。これは培地の選択性、あるいは培養に使用した高温度 (44.5℃) のどちらかによるものであろう (21, 22)。試料中の菌体が環境因子及び/または化学物質によって致死寸前の損傷を受けている場合には、このような陰性誤判断が特に起こりやすい (17, 18)。最近EPAによってMF試験を確認の手順を用いて補うための改良法が提案されており、それによるとMPN試験におけるBGLBブロスと同様LSTブロスを用いて気体産生を調べるのに各紙上に最低10個のコロニーがなければならぬ (14)。この改良法を用いれば陰性及び陽性の両誤判断は減るであろうけれども、材料費が高くなりMF試験に要する時間は24時間から72時間へと3倍になる。

【0021】1982年にFengとHartmanは4-メチルウンベリフェロングルクロニド (MUG) を基質として使用した *E. coli* 検出のための蛍光発生試験を導入した (13)。*E. coli* の細胞がβ-グルクロニダーゼという酵素を産生し、それによって基質を切断して蛍光を発する4-メチルウンベリフェロンラ

ジカルを放出するのである (19)。MUG化合物を推定試験のLST培地に加えることによって、LST-MUG培地の試験管1本で糞便大腸菌型に関する推定データ (気体産生) 及び確認データ (蛍光) の両方が24時間以内に得られるようになった。MUG試験は迅速で簡単であるが、*E. coli* の85~95%しかこの酵素を産生しないため (出所による)、試験は100%信頼性をもつわけではない。またこの系は大腸菌型群には適用できない。現在1つの試料中の大腸菌型及び糞便大腸菌型を検出し計数するのに適切な試験はない。簡単に迅速、信頼性のある検出試験が開発されれば、経費及び時間の節約になるばかりでなく、水道設備や食品加工、取扱いの管理がずっと効率よく行われることになる。

【0022】

【課題を解決するための手段】本発明は予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に約10⁻³モル以下の濃度で存在する目的分析物を検出するための方法に関するもので、以下の部分から構成されている。

a) 試料を (i) 試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び (ii) 目的分析物と結合することができる、ような試薬と接触させる。ただし分析物と試薬が結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適条件下で与える。c) このようにして放出された電磁放射線を検出し、それによって試料中の分析物の存在も検出する。

【0023】また本発明は予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に約10⁻³モル以下の濃度で存在する目的分析物を検出するための競合的方法に関するものでもあり、以下の部分から構成されている。

a) 試料を (i) 試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び (ii) 試料中には通常存在しない相補的材料の結合部位について目的分析物、及び相補的材料と競合し得る、ような試薬と接触させる。ただし目的分析物と試薬が相補的材料と競合的に結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適条件下で与える。c) このようにして放出された電磁放射線を検出し、それによって試料中の分析物の存在も検出する。また予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に存在する目的分析物の量を定量的に測定するための方法に関するものも含み、以下の部分から構成されている。a) 試料

を既知量の (i) 試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び (ii) 目的分析物と結合することができる、ような試薬と接触させる。ただし分析物と試薬が結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適条件下で与える。c) このようにして放出された放射線の量を定量的に測定し、それによって試料中に存在する目的分析物の量も定量的に測定する。

【0024】本発明はさらに予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に存在する目的分析物の量を定量的に測定するための競合的方法に関するものも含む。この方法は以下の部分から構成されている。a) 試料を既知量の (i) 試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び (ii) 試料中には通常存在しない相補的材料の結合部位について目的分析物、及び既知量の相補的材料と競合し得る、ような試薬と接触させる。ただし目的分析物と試薬が相補的材料と競合的に結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適条件下で与える。c) このようにして放出された放射線の量を定量的に測定し、それによって試料中に存在する目的分析物の量も定量的に測定する。

【0025】また液体食品、食品ホモジネート中に多数存在する目的分析物を検出し同定するための方法に関するものも含む。この方法は以下の部分から構成されている。a) 液体または固体懸濁液に浸すのに適切で多数の試薬に対して固定された診断試薬ホルダーを液体食品あるいは食品ホモジネート中に浸す。ただし各試薬は診断試薬ホルダーの明確に区別できる位置に固定し、固定された試薬-目的分析物複合体が形成されるよう目的分析物1種類ずつと複合体を形成し得るようになる。b) 液体食品あるいは食品ホモジネート中から診断試薬ホルダーを取り除く。c) 適当な洗浄溶液を用いて診断試薬ホルダーを洗浄する。d) 固定された試薬-目的分析物複合体を含む判断試薬ホルダーを、固定された試薬-目的分析物複合体と複合体を形成することができ、固定された試薬-目的分析物検出試薬複合体を形成し得るような最低1種類の検出試薬を含む検出溶液中に浸す。e) 試薬が、固定された試薬-目的分析物-検出試薬複合体として固定されている診断試薬ホルダーの同定可能な部分を検出し、それによって液体食品あるいは食品ホモジネート中に多数存在する目的分析物を検出し同定する。

【0026】本発明はまた試料中に多数存在するエンテロトキシン類を検出し同定するのに有用なキットも含む。このキットは以下の部分から構成されている。a) 液体または固体懸濁液に浸すのに適切のように表面部分に連結された取っ手のついた診断試薬ホルダー；ただし上記の表面部分には最低1枚のニトロセルロース膜がついており、このニトロセルロース膜上には区別し得る位置に別々に明確に固定された各種モノクローナル抗体がつけてあり、固定されたモノクローナル抗体はそれぞれ1種類のエンテロトキシンの抗原決定基に対し特異的なものとなっている；b) 界面活性剤入り水性緩衝溶液から成る第一洗浄溶液；c) 最低1種類のモノクローナル抗体酵素結合から成る検出部；モノクローナル抗体は各エンテロトキシンに対する異なる抗原決定基に特異的なもので、診断試薬ホルダーにつけられたニトロセルロース膜上に固定されている；d) バッファー水溶液からなる第2洗浄液；e) 検出溶液中のモノクローナル抗体に結合された酵素と反応し得る酵素基質；及びf) 無色染液。

【0027】本発明には1つの試料中の細菌最低1種の存在を検出するための方法も含まれる。この方法は以下の部分から構成されている。a) 試料を開放式で細菌種の増殖に適する培地を含む容器中に接種する。b) キャップを容器の端に連結する。このキャップの面は容器に連結した時に容器の内部と接触するようになっており表面が最低1つの細菌成分を固定するのに適切な構造となっている。c) 培地中に接種された細菌が増殖し得るような条件下で、接種された培地を培養する。d) 容器の上下を適当な時間の間反転させ、培地中に存在する細菌成分が容器の内部に面したキャップの表面上に固定されるようにする。e) 容器の上下を反転させ正しい方向に戻す。f) 容器からキャップを取りはずす。g) 細菌成分が固定されているキャップの表面を、固定された細菌成分-試薬複合体が形成されるのに適切な条件下で、固定された細菌成分と複合体を形成し得る試薬に接触させる。h) 固定された細菌成分-試薬複合体を検出し、それによって試料中の細菌種の存在をも検出する。

【0028】さらに本発明には試料中の大腸菌型細菌の存在を検出するための方法も含まれる。この方法は以下の部分から構成されている。a) 試料を開放式で非選択的乳糖培地及び倒立Durhamを入れた容器中に接種する。b) ポリスチレン挿入物をつけたキャップを各容器の開放側の端に連結する。c) 接種された培地を37℃で最低2時間培養する。d) 各容器中に倒立させたDurhamバイアル内に採取されている細菌発酵により産生された気体があるかどうかを検出する。e) 倒立させたDurhamバイアル内に気体が採取されている容器の上下を適当な時間の間反転させ、培地中に存在する大腸菌型細菌が大腸菌型-ポリスチレン複合体を形成し得るようになる。f) 容器の上下を反転させ正しい方向に

戻す。g) 容器からキャップを取りはずす。h) 取りはずしたキャップのポリスチレン挿入物を、未結合部位をふさぐのに適切な物質を用いて処理する。i) 未結合部位をふさぐのに適切な物質を用いて処理されたキャップのポリスチレン挿入物を、抗体-大腸菌型-ポリスチレン複合体が形成し得るような条件下で大腸菌型細菌に結合でき検出可能となる標識物によって標識した抗大腸菌型細菌抗体最低1種類を用いて処理する。j) ポリスチレン挿入物上の抗体-大腸菌型-ポリスチレン複合体の存在を検出し、それによって試料中の大腸菌型細菌の存在をも検出する。

【0029】図の説明要約

第1図は溶液中の一種の抗原の濃度を測定するための均質系イムノアッセイ用に用いられるエレクトロ化学ルミネセンス測定法について表わしたものである。第2図は均質系ECLテオフィリン試験の結果をグラフに表わしたものである。第3図は各種血清における均質系テオフィリン試験の結果をグラフに表わしたものである。

●=正常血清

▲黒四角▼=溶血血清

◆=脂肪血症血清

□=黄疸血清

第4図はECLテオフィリン試験の結果を蛍光偏光テオフィリン試験の結果と比較しグラフに表わしたものである。

A. 正常血清: $n=4$; 傾き=0.986; $r=1.00$

B. 溶血血清: $n=3$; 傾き=0.878; $r=1.00$

C. 脂肪血症血清: $n=5$; 傾き=0.872; $r=0.99$

D. 黄疸血清: $n=4$; 傾き=2.14; $r=1.00$

第5図はECLテオフィリン試験の結果を高速液体クロマトグラフィー試験の結果と比較しグラフに表わしたものである。

【0030】 $n=9$; 傾き=1.197; $r=0.98$

第6図はECLジゴキシニウムノアッセイにおいて産生されたECL信号の調整をグラフに表わしたものである。第7図はECLジゴキシニウムノアッセイの結果をグラフに表わしたものである。

▲黒四角▼: 対照

●: ジゴキシニ

第8図はMBI38-化合物Iの各濃度において産生されたECL信号をグラフに表わしたものである。第9図はMBI38-化合物Iのハイブリッド形成/感受性試験の結果を示したものである。

TAG=化合物I

第10図はMBI38-化合物Iの特異性試験の結果を示したものである。

【0031】本発明の詳細

本発明は予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に約 10^{-3} モル以下の濃度で存在する目的分析物を検出するための方法に関するもので、以下の部分から構成されている。a) 試料を(i) 試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び(ii) 目的分析物と結合することができる、ような試薬と接触させる。ただし分析物と試薬が結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適条件下で与える。c) このようにして放出された電磁放射線を検出し、それによって試料中の目的分析物の存在をも検出する。本出願において「モル」とは、溶液中に1リットル当たり存在する分析物の濃度をモルで表わしたものの、あるいは液体試料中に1リットル当たり存在する粒子またはユニットで粒子状物質の量を表わしたものを意味する。例えば1リットル中 1×10^{23} 個の粒子のことを1モルと表わす。

【0032】本発明における方法は、不均一試験すなわち結合した標識試薬に電気化学的エネルギーを与える前に結合した標識試薬から未結合標識試薬を分離する試験と、均質系試験すなわち未結合標識試薬と結合した標識試薬の両方に同時に電気化学的エネルギーを与える試験として実施されるものである。本発明の均質系試験においては、結合した標識試薬から放出された電磁放射線は、未結合標識試薬と比較して結合した標識試薬から放出された電磁放射線の量が増加したか減少したか、あるいは波長の異なる電磁放射線によって未結合標識試薬から放出された電磁放射線と区別し得る。従って本発明の1つの具体例として、目的分析物と結合していない試薬はすべて、試料に電気化学的エネルギーを与える前に試薬と接触した試料から分離されることになる。本発明のもう1つの具体例では、試料を試薬と接触させる前に、目的分析物を固定するために試料を処理する。目的分析物の固定方法はその技術分野ではよく知られているものであり、試料をポリスチレン、ニトロセルロース、ナイロンの表面に接触させるか、または全細胞、準細胞粒子、ビールス、プリオン、ピロイド、脂質、脂肪酸、核酸、多糖、タンパク質、リボタンパク質、リボ多糖、糖タンパク質、ペプチド、細胞代謝産物、ホルモン、薬理学的試薬、精神安定薬、バルビツール酸塩、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、非生物学的ポリマー、合成有機分子、有機金属化合物分子、無機分子でコーティングした表面に接触させるのである。また目的分析物が以上の物質の中のどれかであってもよい。本発明の1つの具体例では、目的分析物がテオフィリンである。また別の具体例では目的分析物がジゴキシニである。さらに別の具体例では目的分析物がヒト繊維毛

性ゴナドトロピン (hCG) である。また目的分析物が全細胞、準細胞粒子、ビールス、プリオン、ピロイド、核酸、タンパク質、リボタン白質、リボ多糖、糖タン白質、ペプチド、ホルモン、薬理学的試薬、非生物学的ポリマー、合成有機分子、有機金属化合物分子、無機分子であることも可能で、試料中に約 10^{-12} モル以下の濃度で存在するこれらの物質を分析できる。さらに目的分析物が試料中に約 10^{-15} モル以下の濃度で存在する全細胞、準細胞粒子、ビールス、プリオン、ピロイド、核酸であることも可能である。

【0033】試料と接触させる試薬は、全細胞、準細胞粒子、ビールス、プリオン、ピロイド、脂質、脂肪酸、核酸、多糖、たん白質、リボタン白質、リボ多糖、糖タン白質、ペプチド、細胞代謝産物、ホルモン、薬理学的試薬、精神安定薬、バルビツール酸塩、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、非生物学的高分子、合成有機分子、有機金属化合物分子、無機分子、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジンに結合したエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種を含むものである。本発明の1つの具体例では試薬は抗体、抗原、核酸、ハプテン、リガンドまたは酵素、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジンに結合したエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種である。

【0034】エレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてはルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、プラチナ、パラジウム、モリブデン、テクネチウムから成る群から選択した金属を含む有機化合物が用いられる。本発明の1つの具体例では金属はルテニウムあるいはオスミウムを使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてルブレンまたは9, 10-ジフェニルアントラセンを使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス〔(4, 4'-カルボメトキシ)-2, 2'-ビピリジン〕2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-yl)プロピル]-1, 3-ジオキソランルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビピリジン)[4-(ブタン-1-a1)-4'-メチル-2, 2'-ビピリジン]ルテニウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビピリジン)[4-(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-yl)-酪酸]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種として(2, 2'-ビピリジン)[シス-ビス(1, 2ジフェニルホスフィン)エチレン]{2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-yl)プロピル]-1, 3-ジオキソラン}オスミウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ

化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビピリジン)[4-(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン)-ブチラミン]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビピリジン)

[1-ブromo-4(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-yl)ブタン]ルテニウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビピリジン)マレイミドヘキサン酸、4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-ブチラミドルテニウム(II)を使用している。

【0035】試料は固体、乳濁液、懸濁液、液体、気体から得たものが使用できる。さらに水、食品、血液、血清、尿、便、組織、唾液、油、有機溶剤、空気から得た試料も使用できる。また試料中にアセトニトリル、ジメチルスルフォキシド、ジメチルホルムアミド、n-メチルピロリジノン、第三級ブチルアルコールが含まれていても使用できる。試料中に還元剤あるいは酸化剤が含まれていても使用できる。また本発明は予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に約 10^{-3} モル以下の濃度で存在する目的分析物を検出するための競合的方法に関するものであり、以下の部分から構成されている。a) 試料を(i) 試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び(ii) 試料中には通常存在しない相補的材料の結合部位について目的分析物、及び相補的材料と競合し得る、ような試薬と接触させる。ただし目的分析物と試薬が相補的材料と競合的に結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適条件下で与える。c) このようにして放出された電磁放射線を検出し、それによって試料中の目的分析物の存在をも検出する。

【0036】試薬はエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種に結合した目的分析物、あるいはエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種に結合した目的分析物の類似体を用いる。また目的分析物としてテオフィリン、ジゴキシン、hCGが使用できる。エレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてはビス〔(4, 4'-カルボメトキシ)-2, 2'-ビピリジン〕2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-yl)プロピル]-1, 3-ジオキソランルテニウム(II)が使用できる。また本発明の別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビピリジン)[4-(ブタン-1-a1)-4'-メチル-2, 2'-ビピリジン]ルテニウム(II)を使用して

いる。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-イル)-酪酸]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種として(2, 2'-ビビリジン)[シス-ビス(1, 2-ジフェニルホスフィノ)エチレン][2-[3-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-イル)プロピル]-1, 3-ジオキソラン]オスミウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン)-ブチラミン]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[1-ブプロモ-4-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-yl)ブタン]ルテニウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)マレイミドヘキサン酸、4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-ブチラミドルテニウム(II)を使用している。

【0037】相補的材料としては全細胞、準細胞粒子、ビールス、プリオン、ビロイド、脂質、脂肪酸、核酸、多糖、タン白質、リポタン白質、リポ多糖、糖タン白質、ペプチド、細胞代謝産物、ホルモン、薬理学的試薬、精神安定薬、バルビツール酸塩、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、非生物学的高分子、合成有機分子、有機金属化合物分子、無機分子を使用することができる。

【0038】本出願の範囲内ではここに述べる方法は目的分析物を定量するために用いるものである。従って本発明は予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に存在する目的分析物の量を定量的に測定するための方法に関するものも含み、以下の部分から構成されている。a) 試料を既知量の(i)試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び(ii)目的分析物と結合することができる、ような試薬と接触させる。ただし分析物と試薬が結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適条件下で与える。c) このようにして放出された放射線の量を定量的に測定し、それによって試料中に存在する目的分析物の量をも定量的に測定する。本方法は不均一試験としても均一系試験としても使用できる。本発明の1つの具体例では目的分析物と結合していない試薬はすべて、試料に試薬がくり返し放射線を放出

し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える前に、既知量の試薬と接触した試料から分離される。また本発明の別の具体例では、試料を試薬と接触させる前に、目的分析物を固定するために試料を処理する。

【0039】目的分析物としては全細胞、準細胞粒子、ビールス、プリオン、ビロイド、脂質、脂肪酸、核酸、多糖、タン白質、リポタン白質、リポ多糖、糖タン白質、ペプチド、細胞代謝産物、ホルモン、薬理学的試薬、精神安定薬、バルビツール酸塩、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、非生物学的高分子、合成有機分子、有機金属化合物分子、無機分子であることが可能である。本発明の1つの具体例では目的分析物がテオフィリンである。また本発明の別の具体例では目的分析物がジゴキシンである。さらに本発明の別の具体例では目的分析物がhCGである。試料と接触させる試薬は、全細胞、準細胞粒子、ウイルス、プリオン、ビロイド、脂質、脂肪酸、核酸、多糖、タン白質、リポタン白質、リポ多糖、糖タン白質、ペプチド、細胞代謝産物、ホルモン、薬理学的試薬、精神安定薬、バルビツール酸塩、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、非生物学的ポリマー、合成有機分子、有機金属化合物分子、無機分子に結合したエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種である。本発明の1つの具体例では試薬は抗体、抗原、核酸、ハプテン、リガンドまたは酵素、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンに結合したエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種である。

【0040】エレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてはルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、プラチナ、パラジウム、モリブデン、テクネチウムから成る群から選択した金属を含む有機化合物が用いられる。本発明の1つの具体例では金属はルテニウムあるいはオスミウムを使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてルブレンまたは9, 10-ジフェニルアントラセンを使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス[(4, 4'-カルボメトキシ)-2, 2'-ビビリジン]2-[3-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-yl)プロピル]-1, 3-ジオキソランルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(ブタン-1-yl)-4'-メチル-2, 2'-ビビリジン]ルテニウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-yl)-酪酸]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化

学種として(2, 2'-ビビリジン)〔シス-ビス(1, 2-ジフェニルホスフィノ)エチレン〕{2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-y1)プロピル]-1, 3-ジオキソラン}オスミウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン)-ブチラミン]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[1-ブromo-4(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4-y1)ブタン]ルテニウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)マレイミドヘキサン酸、4-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-ブチラミドルテニウム(II)を使用している。

【0041】試料は固体、乳濁液、懸濁液、液体、気体から得たものが使用できる。さらに水、食品、血液、血清、尿、便、組織、唾液、油、有機溶剤、空気から得た試料も使用できる。また試料中にアセトニトリル、ジメチルスルフォキシド、ジメチルホルムアミド、n-メチルピロリジノン、第三級ブチルアルコールが含まれていても使用できる。試料中に還元剤あるいは酸化剤が含まれていても使用できる。本発明はまた予め測定された量の多成分液体試料において、その試料中に存在する目的分析物の量を定量的に測定するための競合的方法に関するものも含む。この方法は以下の部分から構成されている。a) 試料を既知量の(i)試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになる、及び(ii)試料中には通常存在しない相補的材料の結合部位について目的分析物、及び既知量の相補的材料と競合し得る、ような試薬と接触させる。ただし目的分析物と試薬が相補的材料と競合的に結合するのに最適な条件下で接触させる。b) このようにして得た試料に、試薬がくり返し放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を与える。ただし試薬がくり返し電磁放射線を放出し得るような最適な条件下で与える。c) このようにして放出された放射線の量を定量的に測定し、それによって試料中に存在する目的分析物の量をも定量的に測定する。目的分析物としてテオフィリン、ジゴキシン、hCGが使用できる。

【0042】本発明の1つの具体例では試薬はエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種に結合した目的分析物、あるいはエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種に結合した目的分析物の類似体を用いている。エレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてはビス

〔(4, 4'-カルボメトキシ)-2, 2'-ビビリジン〕2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビビリジン-

4-y1)プロピル]-1, 3-ジオキソランルテニウム(II)が使用できる。また本発明の別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(ブタン-1-a1)-4'-メチル-2, 2'-ビビリジン]ルテニウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(4-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-y1)-酪酸]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種として(2, 2'-ビビリジン)〔シス-ビス(1, 2-ジフェニルホスフィノ)エチレン〕{2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-y1)プロピル]-1, 3-ジオキソラン}オスミウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[4-(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン)ブチラミン]ルテニウム(II)を使用している。また別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)[1-ブromo-4(4'-メチル-2, 2'-ビビリジン-4-イル)ブタン]ルテニウム(II)を使用している。さらに別の具体例ではエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種としてビス(2, 2'-ビビリジン)マレイミドヘキサン酸、4-メチル-2, 2'-ビビリジン-4'-ブチラミドルテニウム(II)を使用している。

【0043】相補的材料としては全細胞、準細胞粒子、ビールス、プリオン、ピロイド、脂質、脂肪酸、核酸、多糖、タン白質、リポタン白質、リポ多糖、糖タン白質、ペプチド、細胞代謝産物、ホルモン、薬理学的試薬、精神安定薬、バルビツール酸塩、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、非生物学的ポリマー、合成有機分子、有機金属化合物分子、無機分子を使用することができる。本発明はまた液体食品、食品ホモジネート中に多数存在する目的分析物を検出し同定するための方法に関するものも含む。この方法は以下の部分から構成されている。a) 液体または固体懸濁液に浸すのに適切で多数の試薬に対して固定された診断試薬ホルダーを液体食品あるいは食品ホモジネート中に浸す。ただし各試薬は診断試薬ホルダーの明確に区別できる位置に固定し、固定された試薬-目的分析物複合体が形成されるよう目的分析物1種類ずつと複合体を形成し得るようにする。b) 液体食品あるいは食品ホモジネート中から判断試薬ホルダーを取り除く。c) 適当な洗浄溶液を用いて判断試薬ホルダーを洗浄する。d) 固定された試薬-目的分析物複合体を含む判断試薬ホルダーを、固定された試薬-目的分析物複合体と複合体を形成することができ、固定された試薬-目的分析物-検出試薬複合体を形成し得るような最低1種類の検出試薬を含む検出溶

液に浸す。e) 試薬が、固定された試薬—目的分析物—検出試薬複合体として固定されている判断試薬ホルダーの同定可能な部分を検出し、それによって液体食品あるいは食品ホモジネート中に多数存在する目的分析物を検出し同定する。

【0044】目的分析物としては微生物を用いることができる。微生物の生死は問わない。また微生物は細菌でもよい。本方法によって検出し得る細菌の例としてはサルモネラ属、カンピロバクター属、エシエリキア属、エルジニア属、バチルス属、ビブリオ酸、レジュネラ属、クロストリジウム属、連鎖球菌属、ブドウ球菌属が挙げられるが、これらの細菌のみに限定されるわけではない。また目的分析物として抗原を用いることができる。このような抗原としてはエンテロトキシン類及びアフマトキシン類が挙げられるが、これに限定されるわけではない。

【0045】固定される試薬及び検出試薬としてはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体の混合物、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の混合物が使用できる。検出試薬は検出可能な標識物を用いて標識することができる。本発明の1つの具体例では検出試薬がそれぞれ同じ検出可能標識物によって標識されている。このような標識物はその技術分野でよく知られているものであり、例えばアルカリ性ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼのような酵素、例えばフルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジニラミノフルオレセイン、テキサスレッドのような蛍光種、例えばルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステルのような化学ルミネセンス種が含まれている。また検出可能標識物として化学種が放射線を放出し得るような適切な源からの電気化学的エネルギー一定量を受けた時に電磁放射線をくり返し放出するようになるエレクトロ化学ルミネセンス化学種も使用できる。このエレクトロ化学ルミネセンス化学種にはルテニウム、オスミウムが含まれる。固定試薬は、診断試薬ホルダーに取りつけたニトロセルロース膜に固定する。

【0046】本発明はまた試料中に多数存在するエンテロトキシン類を検出し同定するのに有用なキットも含む。このキットは以下の部分から構成されている。a) 液体または固体懸濁液に浸すのに適切のように表面部分に連結された取っ手のついた診断試薬ホルダー。ただし上記の表面部分には最低1枚のニトロセルロース膜がついており、このニトロセルロース膜上には区別し得る位置に別々に明確に固定された各種モノクローナル抗体がつけてあり、固定されたモノクローナル抗体はそれぞれ1種類のエンテロトキシンの抗原決定基に対し特異的なものとなっている。b) 界面活性剤入り水性緩衝溶液から成る第一洗浄溶液。c) 最低1種類のモノクローナル

抗体酵素結合から成る検出部。モノクローナル抗体は各エンテロトキシンに対する異なる抗原に決定基に特異的なもので、診断試薬ホルダーにつけられたニトロセルロース膜上に固定されている。e) 検出溶液中のモノクローナル抗体に結合された酵素と反応し得る酵素基質。

f) 無色染液。

【0047】本発明の1つの具体例ではニトロセルロース膜に別々に明確に固定され、各種 *Staphylococcus* エンテロトキシン類の抗原決定基に特異的であるモノクローナル抗体をつけたニトロセルロース膜を使用している。また本発明の別の具体例ではニトロセルロース膜に別々に明確に固定され、*Staphylococcus* のエンテロトキシン A、B、D、E に対して特異的である4種のモノクローナル抗体をつけたニトロセルロース膜を使用している。またこのニトロセルロース膜には、膜に別々に明確に固定され、1種以上の *Staphylococcus* エンテロトキシンの1つの抗原決定基に特異的であるモノクローナル抗体がつけてあることもある。このエンテロトキシンは *Staphylococcus* のエンテロトキシン類 C₁、C₂、C₃ の抗原決定基に特異的なものである。各 *Staphylococcus* エンテロトキシンの抗原決定基に特異的で、ニトロセルロース膜に固定されたモノクローナル抗体が特異性をもつ *Staphylococcus* エンテロトキシンに向けられたモノクローナル抗体に結合されるこのキットの酵素はアルカリ性ホスファターゼ等があり、この酵素と反応し得る酵素基質は5-ブロモ、4-クロロインドリルホスフェート、無色染液はニトロブルーテトラゾリウムである。

【0048】本発明はまた液体あるいは固体懸濁液中に多数存在する *Staphylococcus* のエンテロトキシン類を検出し同定するための方法も含む。この方法は以下の部分から構成されている。a) *Staphylococcus* のエンテロトキシン類に特異的で、診断試薬ホルダーに別々に明確に固定された多数のモノクローナル抗体のついている診断試薬ホルダーを適当な時間液体あるいは固体懸濁液中に浸し、固定されたモノクローナル抗体—*Staphylococcus* エンテロトキシン複合体を形成させる。b) 試料から判断試薬ホルダーを取り除く。c) 界面活性剤入り水性緩衝溶液中に判断試薬ホルダーを浸す。d) 界面活性剤入り水性緩衝溶液から判断試薬ホルダーを取り除く。e) モノクローナル抗体—アルカリ性ホスファターゼコンジュゲートを含む検出溶液中に診断試薬ホルダーを適当な時間浸し、固定されたモノクローナル抗体—*Staphylococcus* エンテロトキシン—モノクローナル抗体—アルカリ性ホスファターゼ複合体を形成させる。f) 検出溶液から診断試薬ホルダーを取り除く。g) 水性緩衝溶液中に診断試薬ホルダーを浸す。h) 水性緩衝溶液から診断試薬ホルダーを取り除く。i) 5-ブロモ、4-

クロロインドリルホスフェート及びニトロブルーテトラゾリウムを含む溶液中に診断試薬ホルダーを浸す。j) 青色沈澱が蓄積したニトロセルロース膜上の同定可能な部分を肉眼で検出する。k) 青色沈澱が蓄積したニトロセルロース膜上の同定可能な部分と、その部分に固定したモノクローナル抗体が特異性を示す *Staphylococcus* エンテロトキシンとを対応させ、それによって試料中の各種 *Staphylococcus* エンテロトキシンの存在を検出し同定する。

【0049】さらに本発明には1つの試料中の細菌最低1種の存在を検出するための方法も含まれる。この方法は以下の部分から構成されている。a) 試料を開放式で細菌種の増殖に適する培地を含む容器の最低1つに接種する。b) キャップを容器の端に連結する。このキャップの面は容器に連結した時に容器の内部と接触するようになっており表面が最低1つの細菌成分を固定するのに適切な構造となっている。c) 培地中に接種された細菌が増殖し得るような条件下で、接種された培地を培養する。d) 容器の上下を適当な時間の間反転させ、培地中に存在する細菌成分が容器の内部に面したキャップの表面上に固定されるようにする。e) 容器の上下を反転させ正しい方向に戻す。f) 容器からキャップを取りはずす。g) 細菌成分が固定されているキャップの表面を、固定された細菌成分一試薬複合体が形成されるのに適切な条件下で、固定された細菌成分と複合体を形成し得る試薬に接触させる。h) 固定された細菌成分一試薬複合体を検出し、それによって試料中の細菌種の存在をも検出する。本出願の範囲内では「細菌成分」とは全細胞、細胞壁成分、細胞膜成分、べん毛成分を含むがこれらに限定されるわけではない。

【0050】最低1つの細菌成分を固定するのに適切なキャップ表面としては、ポリスチレン挿入物、ニトロセルロース膜、ナイロン膜を用いることができる。また表面をポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体の混合物、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の混合物でコーティングしたものも用いられる。固定された細菌成分と複合体を形成し得る試薬にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体の混合物、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の混合物がある。また試薬は例えば検出可能な酵素、蛍光を発する種、化学ルミネセンスを発する種のような検出可能な標識物で標識することもできる。さらに検出可能な標識物としてエレクトロ化学ルミネセンスを発する種を用いることもできる。本発明の1つの具体例ではルテニウムまたはオスミウムを含むエレクトロ化学ルミネセンス種を使用している。また本発明の別の具体例では固定された細菌成分一試薬複合体を検出するのに、固定された細菌成分一試薬複合体と複合体を形成し得る検出可能標識をした第2試薬を使用することもできる。さらに本発明の別の具体例では試薬としてポリクローナ

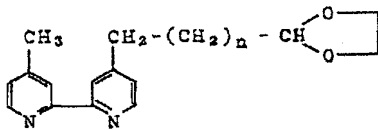
ル抗体、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体の混合物、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の混合物を使用し、第2試薬としてその試薬に対する抗一抗体を検出可能なように標識したものを使用している。

【0051】細菌を検出できる試料には水及び食品も含まれる。本発明の1つの具体例では細菌種の増殖に適する培地として非選択的乳糖培地を使用している。また1つの具体例では培地として非選択的乳糖培地を使用し、検出できる細菌は最低1種類の大腸菌型である。本発明には試料中の大腸菌型細菌の存在を検出するための方法も含まれる。この方法は以下の部分から構成されている。a) 試料を開放式で非選択的乳糖培地及び倒立Durhamを入れた容器の最低1つに接種する。b) ポリスチレン挿入物をつけたキャップを各容器の開放側の端に連結する。c) 接種された培地を37℃で最低2時間培養する。d) 各容器中に倒立させたDurhamバイアル内に採取されている細菌発酵により産生された気体があるかどうか検出する。e) 倒立させたDurhamバイアル内に気体が採取されている容器の上下を適当な時間の間反転させ、培地中に存在する大腸菌型細菌が大腸菌型ポリスチレン複合体を形成し得るようにする。f) 容器の上下を反転させ正しい方向に戻す。g) 容器からキャップを取りはずす。h) 取りはずしたキャップのポリスチレン挿入物を、未結合部位をふさぐのに適切な物質を用いて処理する。(i) 未結合部位をふさぐのに適切な物質を用いて処理されたキャップのポリスチレン挿入物を、抗体一大腸菌型ポリスチレン複合体が形成し得るような条件下で大腸菌型細菌に結合でき検出可能となる標識物によって標識した抗大腸菌型細菌抗体最低1種類を用いて処理する。j) ポリスチレン挿入物上の抗体一大腸菌型ポリスチレン複合体の存在を検出し、それによって試料中の大腸菌型細菌の存在をも検出する。

【0052】本発明の1つの具体例では非選択的乳糖培地はフェノールレッドブロスである。ポリスチレン挿入物上の未結合部位をふさぐのに適切な物質としてはウシ血清アルブミンが使用できる。検出可能な標識物で標識された抗大腸菌型細菌抗体としては検出可能な標識物で標識されたモノクローナル抗体が使用できる。検出可能な標識物としてはモノクローナル抗体に結合した酵素が使用できる。本発明の1つの具体例ではこの酵素として子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼを使用している。また本発明の別の具体例では検出可能な標識物としてモノクローナル抗体に結合した蛍光を発する種を使用している。さらに別の具体例では検出可能な標識物としてモノクローナル抗体に結合したエレクトロ化学ルミネセンスを発する種を使用している。エレクトロ化学ルミネセンスを発する種にはルテニウムやオスミウムが含まれる。本発明の1つの具体例では試料は水である。また本発明の別の具体例では試料は食品である。

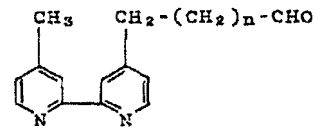
【0053】開放式の容器としてはバイアルが使用できる。また水試料中の大腸菌型細菌を検出するためのキットも含まれる。このキットは以下の部分から構成されている。a) 非選択的乳糖培地の入ったバイアル最低1本、b) Durhamバイアル最低1本、c) ポリスチレン挿入物をつけたバイアルキャップ最低1個、d) ウシ血清アルブミン溶液、e) 抗大腸菌型細菌モノクローナル抗体-酵素結合体、f) 洗浄用水性緩衝溶液、g) 酵素基質溶液。本発明の1つの具体例では抗大腸菌型細菌モノクローナル抗体に結合した酵素は子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼであり、酵素基質はp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムである。本発明は次の構造をもつ化合物も含み、

【化18】



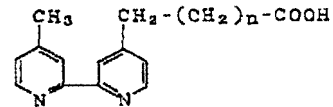
nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは2である。* 20

* する。さらに本発明は次の構造をもつ化合物も含み、
【化19】



nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは2である。また本発明は次の構造をもつ化合物も含み、

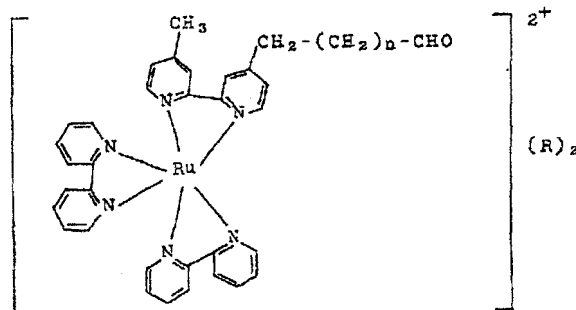
10 【化20】



nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは2である。

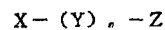
【0054】さらに本発明には次の構造をもつ化合物も含まれ、

【化21】



Rは陰イオンで、nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは2である。この化合物は次の構造をもつ構成物を含み、

【化22】

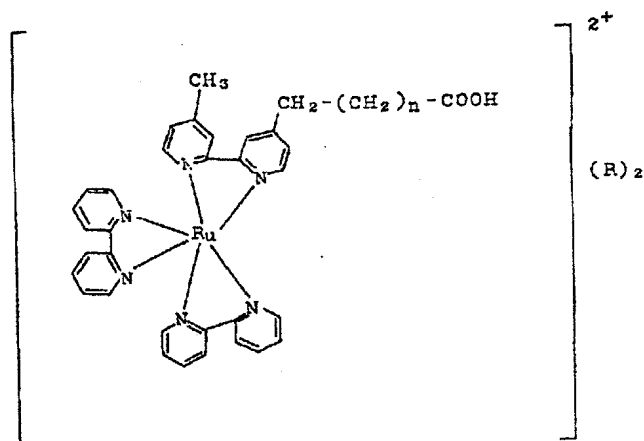


Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、同種または異種のアミノ酸1つ以上、抗体、目的分析物、目的分

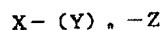
析物の類似体を表わし、nは整数、Zは本発明に含まれる化合物を表わしている。

【0055】また本発明は次の構造をもつ化合物も含み、Rは陰イオンで、nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは2である。

【化23】



この化合物は次の構造をもつ構成物を含み、
【化24】

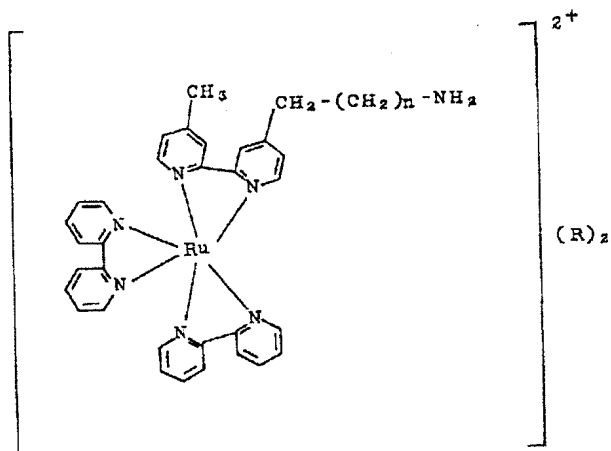


Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、同種または異種のアミノ酸1つ以上、抗体、目的分析物、目的分析物の類似体を表わし、nは整数、Zは本発明に含まれ*

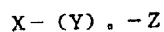
*る化合物を表わしている。

【0056】さらに本発明には次の構造をもつ化合物も含まれ、Rは陰イオンで、nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは3である。

【化25】



この化合物は次の構造をもつ構成物を含み、
【化26】

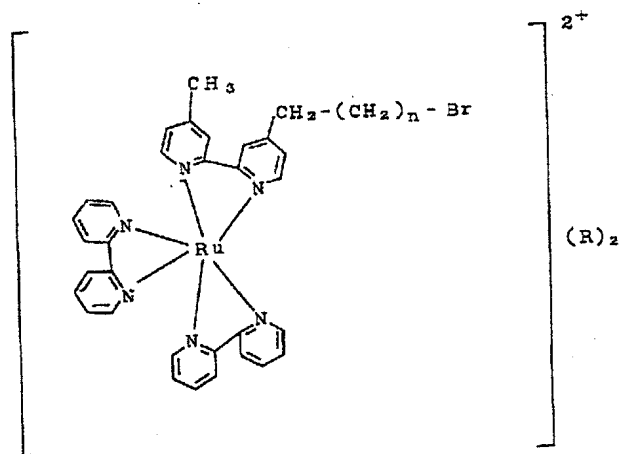


Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、同種または異種のアミノ酸1つ以上、抗体、目的分析物、目的分析物の類似体を表わし、nは整数、Zは本発明に含まれ*

る化合物を表わしている。

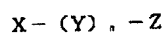
【0057】また本発明は次の構造をもつ化合物も含まれ、Rは陰イオンで、nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは3である。

【化27】



この化合物は次の構造をもつ構成物を含み、

【化28】

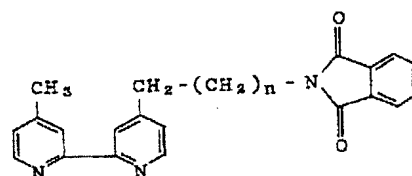


Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、同種または異種のアミノ酸1つ以上、抗体、目的分析物、目的分析物の類似体を表わし、nは整数、Zは本発明に含まれる化合物を表わしている。

【0058】さらに本発明には次の構造をもつ化合物も含まれ、

【化29】

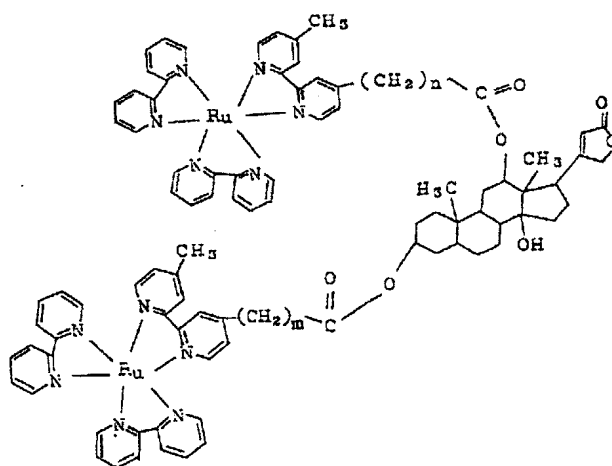
*



nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは3である。また本発明は次の構造をもつ化合物を含み、

【化30】

*

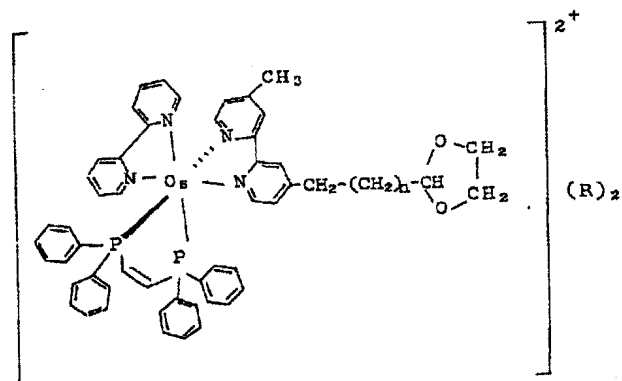


mとnはそれぞれ同じまたは異なる整数である。本発明の1つの具体例ではmとnは両方とも3である。

【0059】さらに本発明には次の構造をもつ化合物も

含まれ

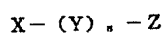
【化31】



Rは陰イオンで、nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは2である。

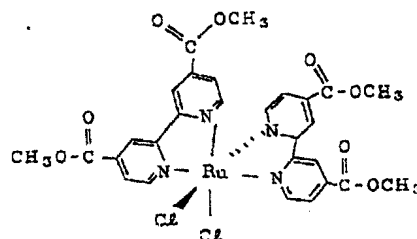
【0060】この化合物は次の構造をもつ構成物を含み

【化32】

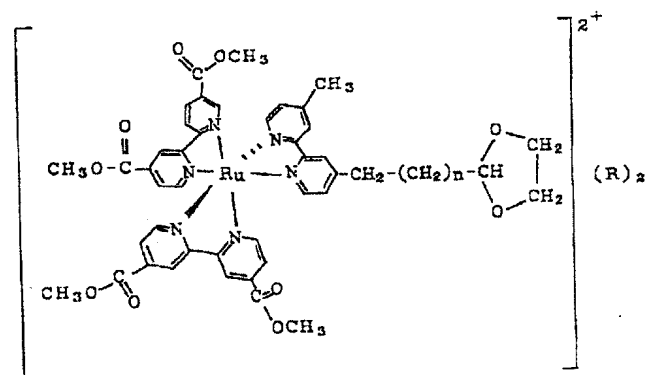


Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、同種または異種のアミノ酸1つ以上、抗体、目的分析物、目的分析物の類似体を表わし、nは整数、Zは本発明に含まれる化合物を表わしている。また本発明は次の構造をもつ化合物を含む。

【化33】



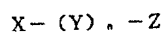
さらに次の構造をもつ化合物も含み、
【化34】



Rは陰イオンで、nは整数である。本発明の1つの具体例ではnは2である。

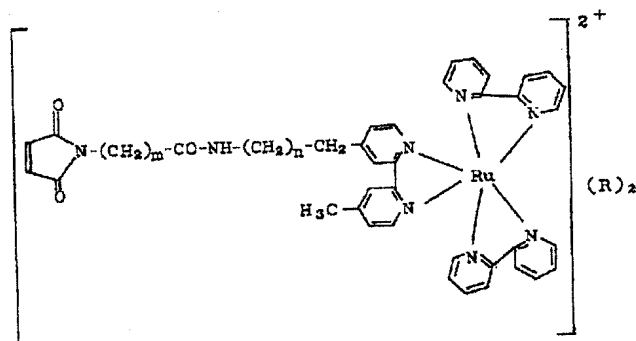
【0061】この化合物は次の構造をもつ構成物を含み

【化35】



Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、同種または異種のアミノ酸1つ以上、抗体、目的分析物、目的分析物の類似体を表わし、nは整数、Zは本発明に含まれる化合物を表わしている。また本発明は次の構造をもつ化合物を含み、

【化36】



Rは陰イオンで、mとnは整数である。本発明の1つの具体例ではmは5、nは3である。

【0062】この化合物は次の構造をもつ構成物を含み

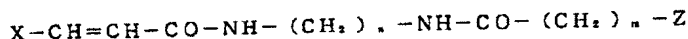
【化37】



Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、同種または異種のアミノ酸1つ以上、抗体、目的分析物、目的分*

*析物の類似体を表わし、nは整数、Zは本発明に含まれる化合物を表わしている。本発明の1つの具体例ではXはデオフィリンである。また本発明の別の具体例ではXはジゴキシゲニンである。さらに本発明の別の具体例ではXはhCG由来のペプチドである。さらに本発明には次の構造をもつ化合物が含まれ

【化38】



Xは同種または異種のヌクレオチド1つ以上、
Zはエレクトロ化学ルミネセンスを発する化学種、
nは1以上の整数、
mは1以上の整数、
をそれぞれ表わしている。

本発明の1つの具体例ではXが5番目の炭素の位置のC Hにつけたチミジン、nが7でmが3である。

【0063】また本発明の別の具体例ではZがビス (2, 2'-ビピリジン) [4-(ブタン-1-a1) 30 -4' メチル-2, 2'-ビピリジン] ルテニウム (I※

※I) である。さらに本発明の別の具体例ではチミジンヌクレオチドが次のヌクレオチド配列につけた3' 末端ヌクレオチドとなっている。

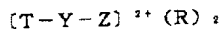
【化39】



G

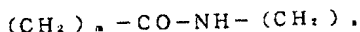
本発明はまた次の構造をもつ化合物を含み、

【化40】



Tはデオフィリン、YはTからZにつくリンカー基、Zはビス- (2, 2'-ビピリジン) [4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-y1] ルテニウム (II)、 40 Rは陰イオンを表わしている。本発明の1つの具体例ではYは8番目のTの位置の炭素についている。また本発明の別の具体例ではYは次の構造をもち、

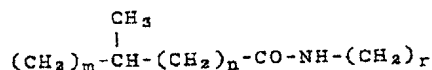
【化41】



mとnは同じまたは異なる1つ以上の整数を表わしている。また別の具体例ではmは3、nは4である。さらに別の具体例ではmとnは両方とも3である。

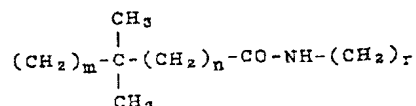
【0064】また本発明の別の具体例ではYは次の構造をもち、

【化42】



m、n、rは同じまたは異なる1つ以上の整数を表わしている。1つの具体例ではmは1、nは1、rは4である。さらに本発明の別の具体例ではYは次の構造をもち、

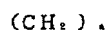
【化43】



m、n、rは同じまたは異なる1つ以上の整数を表わしている。1つの具体例ではmは1、nは1、rは4である。また本発明の別の具体例ではYは7番目のTの位置

の窒素についている。1つの具体例ではYは次の構造をもち、

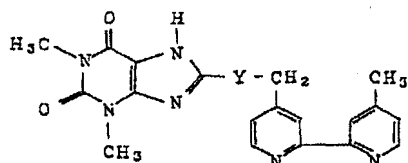
【化44】



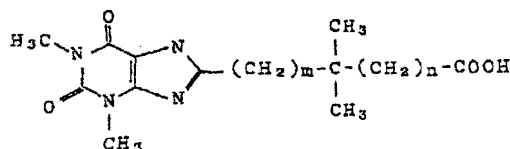
nは1以上の整数である。別の具体例ではnは4である。

【0065】本発明はまた次の構造をもつ化合物を含み、

【化45】



10



mとnは同じまたは異なる整数である。1つの具体例ではmとnは両方とも1である。また次の構造をもつ構成物を含み、

【化48】



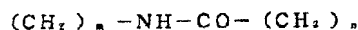
Xはシステインまたはメチオニンの最低1つのアミノ酸から成る同種あるいは異種のアミノ酸1つ以上を表わし、Zは3番目または4番目のマレイミドの位置の炭素によってシステインまたはメチオニンのイオウ置換基につけたビス(2, 2'-ビピリジン)マレイミドヘキサ酸、4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-ブチラミドルテニウム(II)を表わしている。以下に挙げる例は本発明の具体的説明であるが、これに限られるわけではなく、発明明細書に続く承認請求によってその範囲を定めている。

【0067】実施例1-各種有機溶剤中のエレクトロ化学ルミネセンス

トリス(2, 2'-ビピリジル)ルテニウム(II)クロリドヘキサヒドレートのエレクトロ化学ルミネセンスを、以下のようにして調製した溶液10mlを含む15ml 3口丸底フラスコ中で測定した: 1. 5mm×10mmマグネチックスターラーバー、直径1.0mmの銀線標準電極、配合28ゲージプラチナ線対電極、厚さ0.1mmの高度に研磨したプラチナ箔1cm×1cm正方形片に溶接した22ゲージプラチナ線から成る作動電極(プラチナ箔作動電極は直径3/16インチの半円形とし、28ゲージプラチナ線対電極を3/32インチの等距離をおいて囲むようにした)。銀線をEG&G 173型電位調節器/電流調節器のEG&G 178型電

* Yはリンカーアームである。本発明の1つの具体例ではYは次の構造をもち

【化46】



mとnは同じまたは異なる1以上の整数である。1つの具体例ではmは3、nは2である。

【0066】本発明はさらに次の構造をもつ化合物を含み、

【化47】

位計プローブに接続した。プラチナ線対電極とプラチナ作動電極はEG&G 173型電位調節器の陽極及び陰極にそれぞれ接続した。装置はアースした。

【0068】EG&G 175型ユニバーサルプログラマーをつけたEG&G 173型電位調節器を用いて循環電圧電流を測定した。プログラマーは陽極電位+1.75ボルトと陰極電位-1.80ボルトの間を100mV/秒で掃引するように設定した。Hama-matsu R928光電増倍管チューブをKodak #23Aゼラチン(赤色)フィルターをつけたProducts for Research PR1402RF型光電増倍管チューブハウジングの中に入れ、エレクトロ化学ルミネセンスを検出した。光電増倍管チューブハウジングはOriol 7070型光電増倍管検出システムに接続した。循環電圧電流はHouston Instruments 200X-Y型記録計に記録した。循環電圧電流は次の有機溶剤と1mMトリス(2, 2'-ビピリジル)ルテニウム(II)クロリドヘキサヒドレート(Aldrich Chemical Company)及び0.1Mテトラブチルアンモニウムテトラフルオロボレート(TBAPF₄)(Aldrich Chemical Company)とによって産生された。アセトニトリル、n-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、1-メチル-2-ピロリジノン(Aldrich Chemical Company)。また1mMトリス(2, 2'-ビピリジル)ルテニウム(II)クロリドヘキサヒドレート及び0.1M TBAPF₄を含む溶液を調製する時には第三級ブチルアルコールと脱イオン蒸留水の溶液(1:1, v/v)を使用した。

このようにして產生された電圧電流によると、各有機溶剤中でのトリス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム

(II) クロリドヘキサヒドレートの酸化還元電位に変化は見られなかった。

【0069】エレクトロ化学ルミネセンスを肉眼で検出するため、次のようにして溶液を調製した：十分量のトリス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム (II) クロリドヘキサヒドレート及びTBABF₄を上記の有機溶剤分光器用等級 (Aldrich Chemical Company) に溶解し、最終濃度をそれぞれ1mM, 0.1Mとした。この溶液10mlを15ml 3口丸底フラスコに入れた。電極をこの溶液中に浸し、作動電極は+1.75から-1.45ボルトの電位間を振動させエレクトロ化学ルミネセンスが產生されるようにした。エレクトロ化学ルミネセンスは前述の各溶液中で肉眼的に観察した。各種溶剤によるエレクトロ化学ルミネセンスへの影響を定量的に測定するため、次のようにして溶液を調製した：十分量のトリス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム (II) クロリドヘキサヒドレート及びTBABF₄を前述の有機溶剤中に溶解し、最終濃

*度をそれぞれ2mM, 0.2mMとした。この溶液一定量に、強酸化剤過硫酸アンモニウムを36mMの濃度で含有する脱イオン蒸留水を等量加えた。トリス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム (II) クロリドヘキサヒドレートの入っていない対照溶液も調製した。このようにして得た溶液10mlを15ml 3口丸底フラスコに入れた。陰極電位を0から-2.0ボルトまで1/2秒間隔で振動させ、エレクトロ化学ルミネセンスが產生されるようにした。

【0070】Micronta 22191型デジタルマルチメーターに接続したインテグレーターを用い、このようにして得たエレクトロ化学ルミネセンスの光電増倍管チューブ信号の総和を計算することによってエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。エレクトロ化学ルミネセンス信号は振動期間の10秒間の和を求め、mVで記録した。結果は表Iに示す通りで、各種溶剤によってルテニウム (II) クロリドの効率が量的に異なることがわかる。

【表1】

表 I

有機 溶剤	トリスRuBiPy		
	(10 ⁻⁴ M)	対 照	Δ
アセトニトリル	2, 540	104	2, 436
第三級ブチルアルコール	1, 280	0	1, 280
N, N-ジメチルホルムアミド	2, 390	143	2, 247
ジメチルスルホキシド	2, 760	29	2, 731
1-メチル-2-ピロリジノン	1, 630	0	1, 630

* 測定値の単位はすべてmV。

【0071】実施例2—ルテニウム標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンG (IgG) 抗体のエレクトロ化学ルミネセンス検出感度

4, 4'-(ジクロロメチル)-2, 2'-ビピリジル、ビス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム (II) で標識したウサギ抗マウスIgG抗体 (ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体) のエレクトロ化学ルミネセンスを、以下のようにして調製した溶液10mlを含む15ml 3口丸底フラスコ中で測定した：1.5mm×10mmマグネチックスターラーバー、直径1.0mmの銀線準基準電極、配合28ゲージプラチナ線対電極、厚さ0.1mmの高度に研磨したプラチナ箔1cm×1cm正方形片に溶接した22ゲージプラチナ線から成る作動電極 (プラチナ箔作動電極は直径3/16インチの半円形とし、28ゲージプラチナ線対電極を3/32インチの等距離をおいて囲むようにした)。銀線をEG&G 173型電位調節器/電流調節器のEG&G 178型電位計プローブに接続した。プラチナ線対電極とプラチナ作動電極はEG&G 173型電位調節器の陽極及

び陰極にそれぞれ接続した。装置はアースした。

【0072】ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体溶液から放出されたエレクトロ化学ルミネセンスは、Kodak #23Aゼラチン (赤色) フィルターをつけたProducts for Research PR 1402RF型光電増倍管チューブハウジングの中に入れたHamamatsu R928光電増倍管チューブを用いて検出した。光電増倍管チューブハウジングはOriental 7070型光電増倍管検出システムに接続した。陰極電位を0から-2.0ボルトまで1/2秒間隔で振動させ、エレクトロ化学ルミネセンスが產生されるようにした。Micronta 22191型デジタルマルチメーターに接続したインテグレーターを用い、このようにして得たエレクトロ化学ルミネセンスの光電増倍管チューブ信号の総和を計算することによってエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。エレクトロ化学ルミネセンス信号は振動期間の10秒間の和を求め、mVで記録した。ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体の1.25×10⁻⁷Mの保存用溶液は、標識抗体の濃縮

液 (2 mg/ml, 7.5 Ru/抗体) をリン酸緩衝溶液 (PBS) で希釈することにより調製した。この溶液一定量 (80 μ l) を反応容器中の 0.1 M テトラブチルアンモニウムテトラフルオロボレート (TBABF₄) 及び 18 mM 過硫酸アンモニウムを含むジメチルスルホキシド (DMSO) / 脱イオン蒸留水 (1:1) 10 ml に加えた。ルテニウム標識抗体の最終濃度は 1×10^{-9} M とした。前述のようにして電気化学ルミネセンスを測定した。

【0073】ルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 10 保存用溶液の各種希釈溶液をも調製し、これらの溶液一*

* 定量 (80 μ l) を反応容器中のルテニウム標識抗体同溶液に加え、標識抗体の濃度が次のようになるようにした: 5×10^{-9} M, 1×10^{-8} M, 5×10^{-8} M。各溶液の電気化学ルミネセンスを前述のようにして測定した。この測定値を以下の表 II に挙げる。これらの結果から標識抗体 (1×10^{-9} M) の電気化学ルミネセンス検出感度が示され、電気化学ルミネセンスの強度はルテニウム標識抗マウス IgG 抗体の濃度に依存することがわかる。

【表2】

表 II

ルテニウム標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン G (IgG)

抗体の電気化学ルミネセンス (ECL)

ルテニウム標識抗マウス

IgG 抗体の濃度	ECL (mV)
5×10^{-4} M	1810
1×10^{-4} M	892
5×10^{-5} M	418
1×10^{-5} M	72
0	0

【0074】実施例 3 - 固相酵素標識イムノソルベントアッセイ (ELISA) におけるルテニウム標識ウシ血清アルブミン (BSA) の免疫学的反応性

ポリスチレン製マイクロタイター板の各穴を、4, 4' - (ジクロロメチル) - 2, 2' - ビピリジル、ビス (2, 2' - ビピリジル) ルテニウム (II) で標識したウシ血清アルブミン、すなわちルテニウム標識ウシ血清アルブミン (6 Ru/BSA, 20 μ g/ml PBS, 50 μ l/穴) あるいは未標識 BSA (20 μ g/ml PBS, 50 μ l/穴) の十分な濃度の溶液でコーティングし、室温で 1 時間インキュベートした。このインキュベート期間終了後、タイター板を PBS で 1 回当たり 5 分間、3 回洗浄した。6 mg/ml のウサギ抗 BSA 抗体を含む溶液を PBS で 1:20, 000、1:30, 000、1:40, 000、1:50, 000、1:60, 000 に希釈し、ルテニウム標識 BSA あるいは未標識 BSA でコーティングした各穴 2 つずつにこの希釈液を加え、タイター板を室温で 1 時間インキュベートした。前回と同様 PBS を用いて 3 回洗浄した後、各穴にヤギ抗ウサギ IgG - ペルオキシダーゼ結合体 (0.5 mg/ml 溶液を PBS で 1:1000 に希釈) を加えタイター板を室温で 1 時間インキュベートすることにより、結合したウサギ抗 BSA 抗体が存在する

かどうかを検出した。タイター板を前回と同様にして 0.5% Tween 20 を含む PBS で 2 回、PBS で 2 回洗浄した後、過酸化水素 (30%) と 2, 2' - アジノージー [3 - エチルーベンツチアゾリンスルホネート] (KPL, Gaithersburg, MD) とを等量ずつ混合し、そのうち 200 μ l をタイター板の各穴に加えた。室温で 30 分間インキュベートした後、414 nm でタイター板の吸光度測定を行った。ルテニウム標識 BSA あるいは未標識 BSA でコーティングした穴に加えたウサギ抗 BSA 抗体の各希釈液の 2 穴の平均測定値から対照穴のバックグラウンド吸光度の平均値を引いた。これらの補正吸光度を表 V に示す。

【0075】未標識 BSA とルテニウム標識 BSA から得られた曲線は平行で、2 つの曲線の各点の補正吸光度の比は約 0.6 と一定であった。前述の活性化ルテニウム複合体と同じものを用いて調製した同様の Ru/BSA 標識比をもつ他のルテニウム標識 BSA 2 ロットによる実験でも同一の結果が得られた。以上の結果から、ルテニウム標識 BSA は免疫学的反応性を有し、ルテニウムで標識した時の免疫反応性は未標識 BSA と比較して約 60% に達することが示される。

【表3】

表 I I I

414 nmにおける吸光度

ウサギ抗 BSA 抗体希釈	未標識 BSA	ルテニウム 標識 BSA	相対免疫 反応性
20,000	1.06	0.66	62%
30,000	0.83	0.50	60%
40,000	0.67	0.40	60%
50,000	0.56	0.33	59%
60,000	0.47	0.28	60%

【0076】実施例4－競合固相酵素標識イムノソルベントアッセイ (ELISA) におけるルテニウム標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (IgG) 抗体の免疫学的反応性

4, 4' - (ジクロロメチル) - 2, 2' - ビピリジル、ビス (2, 2' - ビピリジル) ルテニウム (II) で標識したウサギ抗マウス IgG 抗体 (ルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG 抗体) について、マウス IgG への結合を酵素標識抗マウス IgG 抗体と競合する能力に関して未標識ウサギ抗マウス IgG 抗体と比較した。96穴ポリスチレン製マイクロタイター板の各穴をマウス IgG 溶液 (5 μ g/ml PBS) でコーティングし、室温で60分間インキュベートした後、PBSで1回当たり5分間、3回洗浄した。ウサギ抗マウス IgG - アルカリ性ホスファターゼ結合体とウサギ抗マウス IgG (1mg/ml) との混合物を含む溶液及びウサギ抗マウス IgG - アルカリ性ホスファターゼ結合体とルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG (1mg/ml、7.5 Ru/抗体) との混合物を含む溶液の2種類を調製した。これら2種類の溶液と、ウサギ抗マウス IgG - アルカリ性ホスファターゼ結合体を含む第3の溶液とを、0.5% Tween-20を含むPBSで1:6000、1:7000、1:8000、1:9000、1:10,000、1:12,000、1:14,000

0、1:16,000に希釈し、マウス IgG を結合させたタイター板の各列に加えた (50 μ l/穴)。タイター板を室温で60分間インキュベートし、PBS-Tween-20で2回、PBSで2回、1回当たり5分間洗浄した。各穴に酵素基質p-ニトロフェニルホスフェート (1.5mg/ml 10%ジエタノールアミン緩衝液、pH9.6) を加え (200 μ l/穴)、タイター板を室温で30分間インキュベートした後、405nmで吸光度測定を行った。3種類の溶液の各希釈液の2穴の平均測定値から対照穴のバックグラウンド吸光度の平均値を引いた。これらの吸光度の値を表VIに示す。

【0077】得られた3本の曲線は平行で、一番上が酵素結合体の結合を阻害しなかった場合、二番目がルテニウム標識抗マウス IgG 及び未標識抗マウス IgG によって阻害した場合である。ルテニウム標識抗マウス IgG の曲線は、酵素結合体の曲線と比較して各点共未標識抗マウス IgG の曲線の値の約81%である。以上の結果から、ルテニウム標識抗マウス IgG 抗体はその抗原 (マウス IgG) に対する免疫学的反応性を有し、マウス IgG への結合を酵素標識抗マウス IgG 抗体と競合する能力は未標識抗マウス IgG 抗体の約80%であることが示される。

【表4】

表 IV
405 nmにおける吸光度

	A	B	C	
	抗マウスIgG	酵素結合体+		
	アルカリ性ホ	ルテニウム	酵素結合体+	
	スファターゼ	標識抗マウス	未標識抗マウ	相対
希 釈	(酵素結合体)	IgG	SIgG	阻害度*
8,000	1.48	0.94	0.79	77%
7,000	1.33	0.82	0.89	79%
8,000	1.21	0.72	0.82	82%
9,000	1.10	0.65	0.56	84%
10,000	1.01	0.60	0.51	82%
12,000	0.87	0.51	0.43	80%
14,000	0.77	0.45	0.37	81%
16,000	0.68	0.40	0.33	80%

$$* (A - B / A - C) \times 100\%$$

【0078】実施例5—ルテニウム標識ウシ血清アルブミン (BSA) のエレクトロ化学ルミネセンス
4, 4' - (ジクロロメチル) - 2, 2' - ビピリジル、ビス (2, 2' - ビピリジル) ルテニウム (II) で標識したウシ血清アルブミン (BSA) (ルテニウム標識ウシ血清アルブミン) の 7.8×10^{-6} M 溶液を、ルテニウム標識 BSA の保存用溶液 (2.6 mg/ml, 6 Ru/BSA) のリン酸緩衝溶液を用いた希釈によって調製した。この溶液 26 μ l を反応容器中の 0.1 M TBABF₄ 及び 18 mM 過硫酸アンモニウムを含む DMSO/脱イオン蒸留水 (1:1) 10 ml *

*に加えた。ルテニウム標識 BSA の最終濃度は 2×10^{-8} M とした。実施例 V と同様にしてエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。同じ方法を用いて未標識 BSA の 7.8×10^{-6} M 溶液を調製し、未標識 BSA の最終濃度が 2×10^{-8} M となるよう反応容器中加入した。この溶液と BSA を含まない同様の溶液のエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。共有結合したルテニウム標識 BSA、未標識 BSA のエレクトロ化学ルミネセンス測定値を表 V に示す。

【表5】

表 V

ルテニウム標識 BSA のエレクトロ化学ルミネセンス (ECL)

溶 液	ECL (mV)
2×10^{-8} M ルテニウム標識 BSA	730
2×10^{-8} M BSA	100
DMSO:H ₂ O (1:1)	0

【0079】実施例6—ルテニウム標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン G (IgG) 抗体のエレクトロ化学ルミネセンス
4, 4' - (ジクロロメチル) - 2, 2' - ビピリジル、ビス (2, 2' - ビピリジル) ルテニウム (II) で標識したウサギ抗マウス IgG 抗体 (ルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG 抗体) の 1.25×10^{-6} M 溶液を、ルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG 抗体の保存用溶液 (2 mg/ml, 7.5 Ru/抗体) のリン酸緩衝溶液を用いた希釈によって調製した。この溶液 80 μ l を反応容器中の 0.1 M TBABF₄ 及び 18 mM

過硫酸アンモニウムを含む DMSO/脱イオン蒸留水 (1:1) 10 ml に加えた。ルテニウム標識抗体の最終濃度は 1×10^{-8} M とした。実施例 2 と同様にしてエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。同じ方法を用いて未標識ウサギ抗マウス IgG 抗体の 1.25×10^{-6} M 溶液を調製し、未標識抗体の最終濃度が 1×10^{-8} M となるよう反応容器中加入した。この溶液と抗体を含まない同様の溶液のエレクトロ化学ルミネセンスも前述のようにして測定した。共有結合したルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG 抗体、未標識ウサギ抗マウス IgG 抗体のエレクトロ化学ルミネセンス測定値を表 V I

IIに示す。

* * 【表6】

表 VI

ルテニウム標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンG (IgG)
抗体のエレクトロ化学ルミネセンス (ECL)

溶液	ECL (mV)
1×10^{-4} ルテニウム標識ウサギ 抗マウス IgG 抗体	892
1×10^{-4} ウサギ抗マウス IgG 抗体	0
DMSO:H ₂ O (1:1)	0

【0080】実施例7—ウシ血清アルブミンに対する抗体の均質系エレクトロ化学ルミネセンスイムノアッセイ 4, 4'—(ジクロロメチル)—2, 2'—ビピリジル、ビス(2, 2'—ビピリジル)ルテニウム (II) で標識したウシ血清アルブミン (BSA) (ルテニウム標識ウシ血清アルブミン) の 7.8×10^{-6} M 溶液を、ルテニウム標識 BSA の保存用溶液 (2.5 mg/ml, 6 Ru/BSA) のリン酸緩衝溶液 (PBS) を用いた希釈によって調製した。この溶液 $26 \mu\text{l}$ を反応容器中の 0.1 M TBABF₄ 及び 18 mM 過硫酸アンモニウムを含む DMSO/脱イオン蒸留水 (1:1) 10 ml に加えた。ルテニウム標識 BSA の最終濃度は 2×10^{-8} M とした。実施例2と同様にしてエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。同じ方法を用いて未標識 BSA の 7.8×10^{-6} M 溶液を調製し、未標識 BSA の最終濃度が 5×10^{-8} M となるよう反応容器中に加えた。この溶液と BSA を含まない同様の溶液のエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。ウサギ抗 BSA ※

抗体の 3.75×10^{-5} M 溶液を、ウサギ抗 BSA 抗体の保存用溶液 (6.0 mg/ml) の PBS を用いた希釈によって調製し、この溶液一定量 ($26 \mu\text{l}$) を反応容器中のルテニウム標識 BSA 溶液に加えてウサギ抗 BSA 抗体の最終濃度が 1×10^{-7} M となるようにした。

【0081】このようにして得たルテニウム標識 BSA 抗原と抗体 (ウサギ抗 BSA) との混合物のエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。表 VII に示した結果から、ルテニウム標識 BSA のエレクトロ化学ルミネセンスはウサギ抗 BSA 抗体を加えると減少することが示され、BSA に対する抗体の均質系エレクトロ化学ルミネセンス検出が可能であることがわかる。以上の結果に基づき、本技術分野の専門家によって他の目的分析物を検出するための均質系エレクトロ化学ルミネセンスイムノアッセイも開発され得るであろう。

【表7】

表 VII

ルテニウム標識ウシ血清アルブミンの抗体結合時における
エレクトロ化学ルミネセンス (ECL) の減少

未標識 BSA (対照)	ルテニウム標識 BSA (抗原)	ウサギ 抗 BSA (抗体)	ECL (mV)
0	2×10^{-6} M	0	727
0	2×10^{-6} M	1×10^{-7} M	92
2×10^{-6} M	0	0	94

【0082】実施例8—マウス免疫グロブリンG (IgG) の均質系エレクトロ化学ルミネセンスイムノアッセイ 4, 4'—(ジクロロメチル)—2, 2'—ビピリジル、ビス(2, 2'—ビピリジル)ルテニウム (II) で標識したウサギ抗マウス IgG 抗体 (ルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG 抗体) の 6.25×10^{-6} M 溶液を、ルテニウム標識ウサギ抗マウス IgG 抗体の保存用溶液 (2 mg/ml, 7.5 Ru/抗体) のリン酸緩衝溶液 (PBS) を用いた希釈によって調製した。この

溶液 $80 \mu\text{l}$ を反応容器中の 0.1 M TBABF₄ 及び 18 mM 過硫酸アンモニウムを含む DMSO/脱イオン蒸留水 (1:1) 10 ml に加えた。ルテニウム標識抗体の最終濃度は 5×10^{-8} M とした。実施例2と同様にしてエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。同じ方法を用いて未標識ウサギ抗マウス IgG 抗体の 6.25×10^{-6} M 溶液を調製し、未標識抗体の最終濃度が 5×10^{-8} M となるよう反応容器中に加えた。この溶液と抗体を含まない同様の溶液のエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。

【0083】マウスIgGの 2.5×10^{-5} M溶液を、マウスIgGの保存用溶液(4.0mg/ml)のPBSを用いた希釈によって調製し、この溶液の2容量($20 \mu\text{l}$ 及び $40 \mu\text{l}$)を反応容器中のルテニウム標識抗マウスIgG溶液に加えてマウスIgGの最終濃度がそれぞれ 5×10^{-8} M、 1×10^{-7} Mとなるようにした。このようにして得たルテニウム標識抗マウスIgG抗体と抗原(マウスIgG)との混合物の電気化学ルミネセンスを測定した。結果は表VIIIに示*

表 VIII

ルテニウム標識抗体の抗原結合時における
電気化学ルミネセンス(ECL)の減少

未標識抗 マウスIgG (対照)	ルテニウム標識 抗マウスIgG (抗体)	マウスIgG (抗原)	ECL (mV)
0	5×10^{-8} M	0	1610
0	5×10^{-8} M	5×10^{-8} M	1360
0	5×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1240
5×10^{-8} M	0	0	0

【0084】実施例9—マウス抗Legionella免疫グロブリンG(IgG)抗体及びルテニウム標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンG(IgG)抗体を用いたLegionellaの異質系電気化学ルミネセンスイムノアッセイ—

細菌Legionella micdadeiのホルマリン化懸濁液を、光学密度1.00(425nm)となるようにPBSで希釈した。約 3×10^9 細胞を円錐形マイクロ遠心チューブに入れた。細胞を遠心し(10分間、10,000RPM)、上清を捨て、Legionella micdadeiに特異的なマウスモノクローナルIgG抗体(1.45mg/ml)のPBS中1:50希釈液(1ml)に細胞を再懸濁した。室温で1時間インキュベートした後、細胞を遠心し、上清を捨て、PBS中に細胞を再懸濁して再び遠心した。上清を捨てた後、4,4'-(ジクロロメチル)-2,2'-ビピリジル、ビス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)で標識したウサギ抗マウスIgG抗体、すなわ

*す。電気化学ルミネセンス測定値がマウスIgG抗原の濃度に依存する様子を図1に示してある。以上の結果から、ルテニウム標識抗体の電気化学ルミネセンスは抗原を加えると減少することがわかる。これらの結果に基づき、本技術分野の専門家によって他の目的分析物の濃度を測定するための均質系電気化学ルミネセンスイムノアッセイも開発され得るであろう。

【表8】

ちルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体(2mg/ml、7.5Ru/抗体)のPBS中1:50希釈液に細胞を再懸濁した。室温で1時間インキュベートした後、細胞を遠心し、上清を捨て、PBS中に細胞を再懸濁して前述のように遠心により2回洗浄した。最後の洗浄の後PBS $200 \mu\text{l}$ 中に細胞を再懸濁した。この細胞懸濁液 $100 \mu\text{l}$ を反応容器中の0.1M TBABF₄及び18mM過硫酸アンモニウムを含むDMSO/脱イオン蒸留水(1:1)10mlに加え、反応容器に移した。この細胞懸濁液の電気化学ルミネセンスを測定した。細胞懸濁液の残り $100 \mu\text{l}$ を反応容器に加え、電気化学ルミネセンスを測定した。実施例2で述べた方法に従い、細胞を含まない溶液の電気化学ルミネセンスを対照として測定した。表IXに示した結果から、ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体を用いたLegionellaの異質系電気化学ルミネセンスイムノアッセイが成功していることがわかる。

【表9】

表 IX

Legionella micdadeiの均質系エレクトロ
化学ルミネセンス (ECL) イムノアッセイ

試料	ECL (mV)
<u>Legionella micdadei</u> 細胞懸濁液	160
DMSO/H ₂ O (1:1) 中 1.9×10^8 細胞	
<u>Legionella micdadei</u> 細胞懸濁液	90
DMSO/H ₂ O (1:1) 中 9.3×10^8 細胞	
DMSO:H ₂ O (1:1)	0

【0085】実施例10—マウス抗Legionella免疫グロブリンG (IgG) 抗体及びルテニウム標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンG (IgG) 抗体を用いたLegionellaの均質系エレクトロ化学ルミネセンスイムノアッセイ—

実施例9で述べたのと同様にして細菌Legionella micdadeiの懸濁液を調製し、Legionellaに特異的なマウスモノクローナルIgG抗体と共にインキュベートした。細胞を遠心し、洗浄し、PBS 0.2ml中に再懸濁した。4, 4'-ジクロロメチル)-2, 2'-ビピリジル、ビス(2, 2'-ビピリジル) ルテニウム(II)で標識したウサギ抗マウスIgG抗体、すなわちルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体 (1.25×10^{-6} M) の一定量 (80 μ l) を細胞懸濁液に加え、混合物を室温で2時間インキュベートした。対照として細胞懸濁液を含まないルテニ-

*ウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体の同一希釈液を同様にインキュベートした。インキュベーション終了後、標識抗体溶液を反応容器中の0.1M TBABF₄及び18mM過硫酸アンモニウムを含むDMSO/脱イオン蒸留水(1:1)10mlに加え、ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体の最終濃度が 1×10^{-8} Mとなるようにした。実施例2と同様にしてエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体を加えた細胞懸濁液についても同様に測定を行った。表Xに示した結果から、エレクトロ化学ルミネセンスの放出がルテニウム標識抗マウスIgG抗体とLegionellaに結合したマウスモノクローナル抗体との間の相互作用によって減少することがわかり、Legionella micdadeiの均質系エレクトロ化学ルミネセンスイムノアッセイが成功していることが示されている。

【表10】

表 X

Legionella micdadeiの均質系エレクトロ
化学ルミネセンス (ECL) イムノアッセイ

試料	ECL (mV)
1×10^{-8} Mルテニウム標識 抗マウスIgG抗体	976
1×10^{-8} Mルテニウム標識 抗マウスIgG抗体+	803
<u>Legionella micdadei</u> に結合した モノクローナル抗体	
DMSO:H ₂ O (1:1)	0

【0086】実施例11—細菌に結合したルテニウム標識抗体放出時のエレクトロ化学ルミネセンス増加
細菌Legionella micdadeiのホルマリン化懸濁液を、光学密度1.00 (425nmで) となるようにPBSで希釈し、この懸濁液2mlを円錐形マイクロ遠心チューブに入れた。細胞を遠心し(10分、10,000RPM)、上清を捨て、Legionella micdadeiに特異的なマウスモノクローナ-

ルIgG抗体 (1.45mg/ml) のPBS中1:10希釈液 (1ml) に細胞を再懸濁した。室温で1時間インキュベートした後、前述のように細胞を遠心し、上清を捨て、PBS中に細胞を再懸濁して再び遠心した。上清を捨てた後、ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgG抗体 (1ml、7.5Ru/抗体) のPBS中1:50希釈液に細胞を再懸濁した。室温で1時間インキュベートした後、前述のように細胞を遠心し、上清を捨て、P

BS中に細胞を再懸濁して前述のように遠心により2回洗浄した。最後の洗浄の後PBSまたは1.0M酢酸-0.9%NaCl(生理食塩水)溶液100 μ l中に細胞を再懸濁し、室温で40分間インキュベートした。遠心後、細胞上清液100 μ lを0.1M TBABF₄及び18mM過硫酸アンモニウムを含むDMSO/脱イオン蒸留水(1:1)10mlと共に反応容器に移した。実施例2で述べた方法に従い、酢酸/生理食塩水細胞上清液とPBS洗浄細胞からの上清液の電気化学ルミネセンスを測定した。電気化学ルミネセン

10 【表11】

表 XI

ルテニウム標識抗マウス免疫グロブリンG(IgG)でコーティングした細胞の上清液の電気化学ルミネセンス(ECL)

溶 液	ECL (mV)
バックグラウンド対照:	
1. 0M酢酸-生理食塩水100 μ l	134
PBS洗浄細胞上清液100 μ l	121
1. 0M酢酸-生理食塩水洗浄細胞上清液100 μ l	214

【0087】実施例12-尿中プレグナン-ジオール-3-グルクロニド(PD3G)の均質系競合イムノアッセイ

尿試料を既知量の電気化学ルミネセンス種で標識したPD3G及び既知量の抗PD3G抗体と、試料中に存在するPD3GとPD3G-電気化学種とが抗体の結合部位に対して競合するような条件下で接触させることによって、プレグナン-ジオール-3-グルクロニド(PD3G)を検出し定量し得る。適当な時間後、得られた試料に電気化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようになる。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在するPD3Gの量を測定することができる。

【0088】実施例13-トリスルテニウムビビリジール-n-ヒドロキシサクシニミドエステルを用いた核酸標識

10mMトリス塩酸(pH8.0)-1mMEDTA中の核酸試料(5~25 μ g)を熱変性させ、冷却し、シトシン残基のエチレンジアミンによる亜硫酸水素塩触媒アミノ基転移を42℃で3時間行って修飾する。5mMリン酸ナトリウム緩衝液pH8.5中で1晩、外液を3回交換して透析を行った後、試料を限外ろ過によって100 μ lまで濃縮する。このようにして修飾した核酸(1~10 μ g)を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH8.5100 μ lで希釈する。トリスルテニウムビビリジール-N-ヒドロキシサクシニミドエステル誘導

*でコーティングしたLegionella細菌を1.0M酢酸-生理食塩水で処理することによって(Ref. 23)ルテニウム標識ウサギ抗マウスIgGをそこから溶離させると、未結合のルテニウム標識抗体により産生される電気化学ルミネセンスが増加することがわかる。以上の結果から、ルテニウム標識抗体はモノクローナル抗体でコーティングしたLegionellaに結合しておりPBSによる洗浄ではバックグラウンドと比較してECLが増加しないことも示される。

【表11】

体を、当該技術分野における既知の方法によってN,N'-ジメチルホルムアミド(DMF)中の0.2M保存用溶液として調製する。このエステル溶液5 μ lを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH8.5中の修飾核酸溶液に加え、室温で1時間インキュベートする。標識した核酸プローブを150mM塩化ナトリウム-10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で外液を最低3回交換しながら透析して精製し、使用時まで4℃で保存する。

【0089】実施例14-血中ヒトT細胞白血病IIウイルス(HTLV-II)の核酸ハイブリッド形成アッセイ

ウイルス粒子からRNAが遊離されるよう血液を処理することによって、全血中のHTLV-IIウイルスを検出し得る。HTLV-IIのRNAを含む試料をHTLV-IIのRNAに相補的で電気化学ルミネセンス種で標識してある一本鎖オリゴヌクレオチドプローブと接触させる。適当な時間後、得られた試料に電気化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出されるようになる。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在するHTLV-IIのRNA量を測定することができる。

【0090】実施例15-臨床試料中Legionella細菌の均質系核酸ハイブリッド形成アッセイ

痰のような臨床試料中のLegionella細菌を、細菌からリボソームRNAが遊離されるよう痰を処理す

ることによって検出し得る。このようにして得た試料をリボソームRNA中の*Legionella*に特異的な配列と相補的でエレクトロ化学ルミネセンス種で標識した一本鎖オリゴヌクレオチドプローブと接触させる。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在する*Legionella*細菌の量を測定することができる。

【0091】実施例16—鎖置換法によってゲノムDNA中に挿入したサイトメガロウイルスDNAを検出するためのハイブリッド形成アッセイ

例えばリンパ球のような組織試料からDNAが遊離され、制限酵素によってDNAが切断されるよう処理することで、ヒトゲノムDNA中のサイトメガロウイルス(CMV) DNAを検出し得る。このようにして得たCMVの二本鎖断片を含む試料を、CMVのDNAに相補的でエレクトロ化学ルミネセンス種で標識してありDNA二本鎖のうちの一方を置換し得る一本鎖オリゴヌクレオチドプローブと接触させる。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在するサイトメガロウイルスRNAの量を測定することができる。

【0092】実施例17—異質法によってヒト膀胱ガン細胞中のras腫瘍遺伝子を検出するためのハイブリッド形成アッセイ

Maniatis, Tら(24)によって以前に報告されている方法を用いて、組織試料からDNAが遊離され、制限酵素によりDNAが切断され、DNAが一本鎖となりニトロセルロース紙に結合するよう処理することで、ヒト膀胱ガン細胞中のras腫瘍遺伝子を検出し得る。一本鎖DNAが結合したる紙をras腫瘍遺伝子に特異的でエレクトロ化学ルミネセンス種で標識したオリゴヌクレオチドプローブと接触させる。適当な反応時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を検出し、それによって試料中に存在するras腫瘍遺伝子を測定することができる。

【0093】実施例18—エレクトロ化学ルミネセンスポリマーを基質とする酵素アッセイ

例えばデンプン、デキストラン、合成高分子ポリマーのような高分子酵素基質をエレクトロ化学ルミネセンス種で標識し得る。標識した基質は多成分系中に存在する酵素を検出し定量するのに使われる。また標識した基質は

抗体、DNAプローブ、RNAプローブ、ストレプトアビジン、ビオチン等と結合した酵素の量を定量するのにも使われる。標識した基質は適当な酵素を用いて選択的により小さい断片へと切断し得る。どのような酵素—基質の組み合わせでも使用できる。酵素の例としてはグルコシダーゼ、リアーゼ、デキストラナーゼ等が挙げられる。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在する酵素の量を測定することができる。それぞれエレクトロ化学ルミネセンス種で標識されている切断断片から増幅されたエレクトロ化学ルミネセンス信号が得られることが利点である。

【0094】実施例19—エレクトロ化学ルミネセンス酵素アッセイによる連鎖球菌属の検出

連鎖球菌属を含む試料を、エレクトロ化学ルミネセンス種で標識した合成ペプチドを含む反応液と接触させる。合成ペプチドはこの細菌のペプチダーゼに特異的な基質を用いる。ペプチダーゼが合成ペプチドに作用することによってエレクトロ化学ルミネセンス種で標識された断片が産生される。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在する連鎖球菌属の量を測定することができる。

【0095】実施例20—エレクトロ化学ルミネセンスを利用したB型肝炎表面抗原の酵素イムノアッセイ

B型肝炎表面抗原(HBsAg)を含む血液試料を、HBsAgに特異的でデキストラナーゼで標識した抗体と適当な時間接触させる。HBsAgと結合していない抗体を除去し、抗原—抗体複合物をエレクトロ化学ルミネセンス種で標識したデキストランと接触させる。デキストラナーゼが標識したポリマーに作用することによってエレクトロ化学ルミネセンス種で標識された各断片が産生される。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在するB型肝炎表面抗原の量を測定することができる。

【0096】実施例21—エレクトロ化学ルミネセンス標識ブラジキニンを用いたブラジキニンリセプターの均質系アッセイ

ブラジキニンリセプターを含む適当な組織試料を調製し、エレクトロ化学ルミネセンス種で標識したブラジキニンと接触させる。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出

し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在するブラジキニンリセプターの量を測定することができる。このアッセイはエストロジエン-エストロジエンリセプターのような他のリガンド-リセプター相互作用を測定するのに也可以使用できる。さらにこのアッセイは、競合結合アッセイの形式を用いれば未標識リガンドの量を測定、定量するのに也可以使用できる。

【0097】実施例22-核酸ハイブリッドの検出におけるエレクトロ化学ルミネセンス種の利用

二本鎖DNA、DNA-RNA二本鎖、二本鎖RNAのような核酸ハイブリッドを含む試料を、特に核酸ハイブリッドの間に挿入し得るエレクトロ化学ルミネセンス種と接触させる。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在する核酸ハイブリッドの量を測定することができる。

【0098】実施例23-エレクトロ化学ルミネセンスを用いた均質系イムノアッセイによる唾液中の抗体と複合体を形成するヒトT細胞白血病ウイルスIII (HTLV-III) 抗原の検出

抗体と複合体を形成するHTLV-IIIを含む唾液試料を、抗原-抗体複合物を分離させるカオトロピック剤を含む溶液と接触させる。次にこの溶液を、HTLV-IIIに特異的でエレクトロ化学ルミネセンス種で標識した抗体と接触させる。カオトロピック剤を除去し、標識抗体、未標識抗体を再び抗原と結合させる。適当な時間後、得られた試料にエレクトロ化学ルミネセンス種がくり返し電磁放射線を放出し得るような電気化学的エネルギー源を直接与えることによって、電磁放射線をくり返し放出するようにする。放出された放射線を定量し、それによって試料中に存在するヒトT細胞白血病ウイルスIII (HTLV-III) 抗原の量を測定することができる。以上の方法は肝炎抗原-抗体複合物、サイトメガロウイルス-抗体複合物、非A非B肝炎-抗体複合物のような血清中の他の型の抗原-抗体複合物を含む試料にも応用できる。

【0099】実施例24-各種Staphylococcusエンテロトキシン類の検出、同定のためのイムノアッセイ

A、B、C、D、Eの各Staphylococcusエンテロトキシンに特異的なモノクローナル抗体とこれらのエンテロトキシンに対して交差反応性をもつモノクローナル抗体とを精製した。各抗体は、腹水をアガロースゲル支持担体に結合させたStaphylococcusのAたん白質カラムにかけ、モノクローナル抗体精製法 (Bio-Rad Laboratories, I

nc.)の一部に基づき結合、溶出、再生緩衝液を流すことによって精製した。精製過程では、通常1ml当たり5~15mgのモノクローナル抗体を含む腹水2mlを、2枚のF-13分析紙 (Schleicher and Schuell, Inc.) の間にMetricellメンブランフィルター (Gelman Sciences, Inc.) を入れ底においた10ml注射器 (Becton Dickenson, Inc.) の中に入れ、ピストンを挿入し、腹水を収集容器中にろ過するという予備ろ過を行った。ろ液に等量の結合緩衝液を加え、5mlのAたん白質-アガロースカラムに重層した。次にカラムの試薬容器に結合緩衝液を入れ溶出を開始した。流出画分の280nmにおける吸光度 (A₂₈₀) をチェックし、1mlずつの画分を採取した。A₂₈₀が安定した基準値に戻ったら、カラムを結合緩衝液5ベッド容量で洗浄し、次に溶出緩衝液を流して精製された免疫グロブリンをカラムから溶離させた。免疫グロブリンを中和するため、溶離画分を1Mトリス塩酸pH9.00.3ml中に採取した。A₂₈₀が再び安定した基準値に戻ったら、カラムを溶出緩衝液5ベッド容量で洗浄し、続いて再生緩衝液10ベッド容量、結合緩衝液5ベッド容量で洗浄してカラムを次の精製過程が行えるよう調整しておいた。精製された免疫グロブリンを含む画分を集め、かくはん式限外ろ過器 (Amicon Corp.) を用いて濃縮した。精製された免疫グロブリンの総たん白質をLowry法により測定したところ、最終濃度は5mg/ml以上であった。精製された抗体は0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (PBS) 中で外液を2回交換しながら4℃で48時間透析した。

【0100】精製されたモノクローナル抗体の特異的エンテロトキシンに対する免疫学的反応性を測定するため、96穴マイクロタイター板ELISA系に分注した。抗体の力価として得られた値を、各抗体の以前に認定されているロットの対照力価値と比較した。十分な力価をもつ抗体を、判断試薬ホルダーすなわちディップスティックに固定するため、あるいはイムノアッセイにおいてプローブとして使用する酵素と結合させるための免疫学的に機能をもつコーティング用抗体として認定した。抗体をニトロセルロース膜の表面に固定して膜を付けた診断試薬ホルダー (ディップスティック) を調製するため、まず膜をリン酸緩衝溶液中に室温で1時間浸して膜の湿潤性を上げた。スティックを溶液から取り出し膜を空気乾燥させた。Staphylococcusの各エンテロトキシンA、B、C、D、Eの1つに特異的な精製モノクローナル抗体または非特異的な対照マウス免疫グロブリン (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) の溶液を2μlずつ膜表面上の異なる位置に直接スポットした。使用した各抗体の濃度はニトロセルロースの結

合部位を飽和し得ることが知られている濃度であった：3A抗体（Aトキシンに特異的） $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2B抗体（Bトキシンに特異的） $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1C3抗体（C1、C2、C3トキシンに特異的） $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3D抗体（Dトキシンに特異的） $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4E抗体（Eトキシンに特異的） $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 、非特異的対照マウス免疫グロブリン $200\mu\text{g}/\text{ml}$ である。ディップスティックを室温で空気乾燥させ、膜上に残っているたん白質結合部位をブロックするためディップスティックを0.5% Tween 20及び3% ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝溶液中に浸した。このブロック溶液中で一晩室温にてインキュベートした後、スティックを空気乾燥させた。

【0101】精製されたモノクローナル抗体2A（A及びEトキシンに特異的）、6B（B、C1、C2、C3トキシンに特異的）、1D（Dトキシンに特異的）を酵素アルカリ性ホスファターゼに共有結合させ、診断試薬ホルダーのディップスティックの膜表面に固定した抗体に結合しているA、B、C1、C2、C3、D、Eトキシンの存在を検出するための結合プローブとして使用した。各結合体はグルタルアルデヒドを2種類の機能をもつ架橋試薬として用いる2段階の化学量論的に制御された段階によって調製した。この段階では、EIA等級アルカリ性ホスファターゼ（ $2500\text{U}/\text{mg}$ 、Boehringer Mannheim Corp.） 0.47ml を、 $13.4\mu\text{l}$ の水性グルタルアルデヒド溶液（25%、Sigma Chemical Co）を含む 50mM リン酸カルシウム緩衝溶液 $\text{pH}7.2$ の 1.2ml 中に加えた。混合物を室温で90分間かくはんし、酵素分子の未結合アミノ基にグルタルアルデヒドを結合させた。インキュベーション終了後、精製されたモノクローナル抗体 $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度のものを 2ml 加え、混合物をさらに90分間かくはんし、氷冷することにより結合反応を終結させた。結合体を0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝溶液中で外液を2回交換しながら 4°C で48時間透析した。透析後の溶液にウシ血清アルブミンを最終濃度3%となるように加え、 4°C での保存中に安定であるようにした。抗体-酵素結合体の特異的エンテロトキシンに対する免疫学的反応性を測定するため、96穴マイクロタイター板ELISA系に分注した。結合体の力価として得られた値を、各結合体の以前に認定されているロットの対照力価値と比較した。十分な力価をもつ結合体を、Staphylococcusエンテロトキシン類のディップスティックアッセイに使用するものとして認定した。

【0102】ハム、ソーセージ、ヌードル、チーズ等のようなStaphylococcusによる食品汚染が最も発生しやすい形の食品を、Staphylococcusエンテロトキシン類のアッセイを実施するため均質系液体懸濁液とした。典型的な抽出方法としては、食

品 20g に水 20ml を加え、Stomacher lab blender (Tekmar Co)を用いて混合物を30秒間ホモジナイズした。より粘性の高い食品の場合には水の容量を2倍にした。ホモジナイズの前または後にStaphylococcusエンテロトキシンを食品に加えた。食品ホモジネートについて上述の診断試薬ホルダーディップスティックを直接使用して試験を行った。エンドトキシンを少量加えた食品試料においても陽性の結果が得られた。Staphylococcusエンテロトキシンの検出感度を上げるため、さらに抽出の段階を加えた。ホモジネートの pH を 6N HCl を用いて通常4.5に調整し、 $20,000\text{g}$ で20分間遠心し、上清の pH を 5N NaOH を用いて7.5に調整し、再び $20,000\text{g}$ で20分遠心し、上清をディップスティックアッセイに直接使用した。このようにして調製した食品抽出物のエンテロトキシン検出感度は、試験した各食品中の各トキシンにつき $1\text{ng}/\text{ml}$ 抽出物であった。牛乳のような液体食品については診断試薬ホルダーディップスティックを液体食品中に浸し固体食品ホモジネートの場合と同じ方法で直接試験を実施した。これらの食品を試験する際にも、上述のような追加抽出段階を加えることにより感度が $1\text{ng}/\text{ml}$ にまで上がるようにした。

【0103】Staphylococcusの個々のエンテロトキシンに特異的なモノクローナル抗体を固定したニトロセルロース膜のついた診断試薬ホルダー（ディップスティック）を、液体食品、食品ホモジネート、または上述のようにして調製した食品抽出物 1ml 、あるいはPBS 1ml の入った試験管中に浸した。以上の溶液にはStaphylococcusエンテロトキシン $1\text{ng}/\text{ml}$ またはそれぞれ $1\text{ng}/\text{ml}$ の濃度のエンテロトキシン類の混合物を加えておいた。ディップスティックをこれらの試料溶液中に室温で1時間、ロータリーシェーカーで振とうしながら浸した。その後ディップスティックを試料から取り出し、0.5% Tween-20を含むPBS中で5分間、PBS単独中で5分間ずつさらに2回振とうした。前述のモノクローナル抗体-アルカリ性ホスファターゼ結合体の混合物を次のようにして調製した：2A結合体（A及びEトキシンに特異的）、6B結合体（B、C1、C2、C3トキシンに特異的）、1D結合体（Dトキシンに特異的）の1:1000希釈液を同一溶液中（0.5% Tween-20及び3% BSAを含むPBS 30ml 中各結合体 $30\mu\text{l}$ ）に調製した。この結合体混合物中にディップスティックを浸し（スティック1本当たり 2ml ）、室温で振とうしながら30分間インキュベートした。ディップスティックをPBS-Tween中で2回、PBS中で3回、1回当たり5分間ずつ振とうしながら洗浄し、膜表面から未結合のモノクローナル抗体-アルカリ性ホスファターゼ結合体を除去した。

【0104】未結合のモノクローナル抗体-酵素結合体を診断試薬ホルダーディップスティックから除去した後、ディップスティックを5-ブロモ-4-クロロインドリルホスフェート (BCIP, Sigma Chemical Co.) 及びニトロブルーテトラゾリウム (NBT, Sigma Chemical Co.) を含む溶液中に浸し、結合した結合体の存在を検出した。BCIP及びNBT溶液はそれぞれ次のようにして調製した: 3. 2mgのBCIPを0.1Mトリス塩酸、0.1M NaCl、5mM MgCl₂溶液10mlに、8. 8mgのNBTを同溶液10mlに溶解した。これらの溶液は使用直前に混合した。ディップスティックを基質混合物中に室温で30分間振とうしながら浸し、その後水で洗浄して空気乾燥させ、アッセイの結果が永久に記録されるようにした。本アッセイの全過程を通じてピペット操作はほとんどあるいは全く必要なく、処理時間も最小限ですみ、約2時間で終了することができる。酵素結合体の基質であるBCIPは膜上のトキシンに結合した結合体によって加水分解され、NBTを還元してディップスティック上の膜に結合する不溶性の青色物質とし得る反応産物を産生する。試料中にStaphylococcusエンテロトキシンが存在し膜上に固定された第1モノクローナル抗体に結合して第2モノクローナル抗体-酵素結合体と結合することによって検出されていれば、ニトロセルロース膜上に青色スポットが出現し指示される。試料中にStaphylococcusエンテロトキシンが存在しない場合は、ニトロセルロース膜は白色のままである。対照のマウス免疫グロブリンを固定した位置の膜も各場合共白色のままであった。A、B、C、D、Eの各Staphylococcusエンテロトキシンに特異的なモノクローナル抗体を固定した膜上の明確に区別し得る位置に青色スポットが出現することによって、特定のエンテロトキシンが同定される。診断試薬ホルダーディップスティックを使用する本方法により、液体食品、食品ホモジネート、食品抽出物中の1種類あるいは複数のStaphylococcusエンテロトキシン類を1ng/mlの量まで検出することが可能である。

【0105】実施例25-大腸菌型細菌の酵素イムノアッセイ (EIA)

本発明の方法 (CAP-EIA MPN) と44. 5℃においてECブロスを使用するEPAによって承認されているMPN確認試験の方法との便中大腸菌型の検出効率を比較するための実験を行った。実験は標準5-バイアルMPNアッセイに以下の変更を加えて実施した。硫酸ラウリルトリプトースブロス (LST, Difco Labs, Detroit, MI) の代わりに、4-メチルウンベリフェロングルクロニド (MUG, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 80 µg/mlを含むフェノールレッド乳糖ブロス

(PRLB, Difco Labs, Detroit, MI) を推定用培地として使用した。

【0106】フェノールレッド染色剤によって乳糖の発酵により産生される酸を検出し得るため、PRLBを選択した。乳糖発酵により得られた気体は、各バイアル中に挿入した倒立Durhamバイアルに集気した。E. coliの存在を予備的に確認するための選択薬剤としてMUGを用いた。便中の主要大腸菌型であるE. coliは、MUGを切断しUV光線下で見える蛍光性ラジカルを遊離させることのできる水中に存在する唯一の細菌である (4, 10)。CAP-EIA MPNアッセイ方法によって次の3種類のデータが得られる: 1) 乳糖の発酵による酸及び気体の産生 (推定大腸菌型アッセイ)、2) MUGの切断による蛍光 (E. coliまたは便中大腸菌型の推定確認)、3) CAP-酵素イムノアッセイ確認 (モノクローナル抗体を利用した確認試験)。次にMUG及びCAP-EIA反応の結果を、ECブロス (Difco, Labs, Detroit, MI) を用いた44. 5℃の高温下での乳糖発酵に基づく標準方法 (1) による結果と比較した。実験は次のようにして行った: MPNアッセイに必要な3種類の10倍希釈系列を作るため、付近の河川から採取した水試料を以下に示す容量で、PRLB-MUG 10mlを含みバイアルキャップの内側にポリスチレン製穴のついたバイアルに接種した。

【0107】系列A-5バイアル、1. 00ml接種

系列B-5バイアル、0. 10ml接種

系列C-5バイアル、0. 01ml接種

その後バイアルをすべて35℃で約18~20時間インキュベートした。次の日すべてのバイアルについて酸及び気体の産生、UV光線下での蛍光を試験した。酸または気体の反応の有無にかかわらず、濁度 (増殖) の見られたバイアルはすべて倒立させ、細胞-培地懸濁液がキャップ内側のポリスチレン製穴を満たすようにした。倒立させたバイアルを35℃で1時間インキュベートし、細菌 (抗原) をポリスチレン製キャップ穴に付着させた。次にキャップ穴に結合した抗原をバイアルから除去し、抗体を用いる確認試験を続けた。

【0108】アッセイのEIA (酵素イムノアッセイ)

の部分を行うため、穴をリン酸緩衝溶液 (PBS, NaCl 8. 5g, Na₂HPO₄ 1. 02g, NaH₂PO₄ · H₂O 0. 386g, 蒸留水で1000mlとする、pH7. 2) 中のウシ血清アルブミン (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 3%溶液で35℃、35分間処理し、ポリスチレン上の未結合部位をすべてブロックした。BSA溶液を捨てた後すぐにPBSで穴を2回洗浄し、E. coli細胞に対するモノクローナル抗体を含むハイブリドーマ細胞上清を各穴に50 µlずつ加え、35℃で1時間インキュベートして抗体をポリスチレンに結

合した特異的抗原 (*E. coli* 細胞) と相互作用させた。抗体上清を捨てた後、PBS-Tween20溶液 (PBS+0.05% Tween20, J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ) を用いて穴を3回洗浄し、未結合抗体を完全に除去した。親和性カラムで精製したアルカリ性ホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (結合体、KPL, Gaithersburg, MD) をPBSで1:1000に希釈し、各穴に50 μ lずつ加えた。35℃で1時間インキュベートした後、PBS-Tween20溶液を用いて穴を4回洗浄し未結合の結合体をすべて除去した。検出に使用するアルカリ性ホスファターゼの基質は、パラニトロフェニルリン酸ナトリウムまたはSigma-104基質 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を10%ジエタノール-アミン緩衝溶液 (ジエタノールアミン97ml, NaN₃ 0.2g, MgCl₂ 6H₂O 100mg, 蒸留水800ml, pH9.8) 中に最終濃度1mg/mlとなるよう溶解したものをを用いた。基質を各穴に100 μ lずつ加え、35℃で30分間インキュベートした後各穴中の反応を肉眼で観察した。本実施例における定量の目的のためには、反応した基質溶液をマイクロタイター板に移し、405nmフィルターをつけたTitertek Multiscan (Flow Laboratories, Mcleans, VA) を用いて機器測定を行った。

【0109】ECブロス (Difco Labs, Detroit, MI) を使用した便中大腸菌型の従来型確認試験を行うため、PRLB中での各一晚培養液からの増殖菌を白金耳ずつ、10mlのECブロスを含み倒立Durhamバイアルを入れた試験管中に無菌的に移した。試験管を標準方法(1)に従い44.5℃で24~48時間インキュベートした後、乳糖発酵の有無を検出した (Durhamバイアル中に採取された気体によって)。バイアル内に少しでも気泡の見られたものは陽性反応と認めた。各実験のデータの概要は表XII及びXIIIに示す通りである。

【0110】実験1の結果から、乳糖からの気体産生に基づく陽性の組み合わせは551であり、MPN統計表によると35大腸菌型/mlである (推定試験)。気体産生陽性 (+) バイアルのうちMUGアッセイで陽性だったのはわずか4本 (A2~A5) であり *E. coli* の含まれていた可能性が高い (*E. coli* または便中大腸菌型の推定確認)。確認試験データのうち従来型EC試験では5本の試験管 (A1~A5) が便中大腸菌型陽性であったのに対し、CAP-EIA法では陽性反応を示したのは4バイアル (A2~A5) のみであった。EIAの陽性測定値は0.55から1.06までの範囲であり、陰性測定値は0.20付近であった。EIA試験とMUG試験のデータでは共に同じバイアルA2~A

5で便中大腸菌型の存在が示されているため、EIAの陽性データはMUGの陽性データによって強く裏付けられている。従来型MPN法 (15, 16, 20) では (+) の誤判断及び (-) の誤判断の発生率が高いため、バイアルA1がMUG及びEIAでは陰性でECでは陽性であったという事実も驚くべきことではない。EC培地では高温度でのインキュベーションによって選択性が変わり便中大腸菌型の回収率に影響することが知られている。また便中大腸菌型 (*E. coli*) のうち約7%はECにおいて気体を産生せず (陰性の誤判断)、非便中大腸菌型のうち8%はECブロス中でも増殖し気体を産生し得る (陽性の誤判断) ことが知られている。すなわち試験管A1中で身られたEC反応は誤判断の陽性反応である可能性があり、MUG及びEIAのA1に関する結果との不一致の原因となっていると思われる。同実験中の他のバイアル (B1~B5, C1~C5) については、すべての試験においてよい相関関係が見られた。言い換えれば、MUGで (-) であったバイアルはECでもEIAでも (-) であり、これらのバイアル中には便中大腸菌型が存在しないことが確認できた。

【0111】実験2においてはバイアルに接種した水試料は、推定試験における全試験管で気体産生が陽性であったため、さらに強く汚染されていたといえる。MPN統計表による陽性の組み合わせは555であり240大腸菌型/ml以上が存在することが示された。確認試験を比較すると、MUG、EC、抗体利用EIAの間にはよい相関関係が見られた。蛍光を示した (MUG+) バイアルはすべてEC及びEIAでも陽性であった。EIA反応の測定値はやや弱い陽性0.46 (B2) からC4で見られた非常に強い反応2.15までの範囲であった。

【0112】以上の2つの実験結果から、本発明における抗体利用CAP-EIA試験は便中大腸菌型の存在を確認するEPAの承認したEC試験と同様に有効であることが示されている。さらにバイアルA1の例で見られるように、CAP-EIA試験は抗体-抗原反応の特異的性質を利用しているため陽性または陰性の誤判断がより少ない。またCAP-EIA試験は従来型MPN試験に比べていくつかの顕著な利点をもっている。すなわち: 1) 簡便さ-推定試験及び確認試験共同のバイアルを用いて行うことができ、液を移したり他の培地を使用する必要がない。2) 迅速さ-CAP-EIA試験は従来型試験に要する時間の1/3から1/2の時間で完了できる。3) 特異性-抗体はその抗原標的に対して高度に特異的である。以上の利点に加えてCAP-EIAのキャップ穴は同一バイアルから4種類の独立したデータ (酸、気体、蛍光、EIA) が得られるような独自のデザインとなっており、水及び/または食品試料中の大腸菌型及び便中大腸菌型を分析するための従来型MPN試験よりもはるかに優れた代替法である。バイアルまた

67

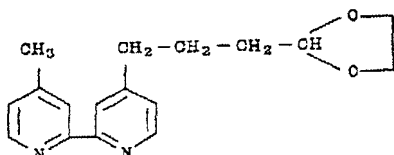
はポリスチレン挿入物を含む試験管キャップを用いてEIAを実施するという構想は大腸菌型または便中大腸菌のアッセイに限定されるものではなく、他の細菌の検出にも同様に応用し得るものである。

【0113】実施例26

2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル)-プロピル]-1, 3-ジオキサランの合成
不活性なアルゴンで気体を置換した600mlの三頸フラスコに、乾燥テトラヒドロフラン (THF) 30mlと乾燥ジイソプロピルアミン7.65ml (54.6 mmol) を、注射器を用いて攪拌しながら添加した。低位型ビーカー中、ドライアイス-イソプロパノールの混合物にフラスコを浸して、溶液を-78℃に冷却した。フラスコに2.5Mn-ブチリチウム21.6ml (54 mmol) をゆっくりと添加した。この溶液を15分間攪拌し、THF 300mlに溶解した4, 4'-ジメチル-2, 2'-ビピリジン9.58g (52 mmol) の溶液を、カニューレを用いて攪拌しながら、1時かけて滴下して加えた。生じた褐色の混合物をさらに-78℃で2時間攪拌し、2-(2-ブロモメチル)-1, 3-ジオキサラン10g (55 mmol) を、注射器を用いて添加し、生じた混合物を、-78℃で5時間攪拌した。その後反応容器を氷浴中 (10℃) に置き、30分経過すると色が変化し始めた (1時間後には、濃紫色となり；2時間後には、青色となり；2.5時間後には、緑色となり；3.25時間後には、レモンイエローとなった)。

【0114】反応混合物に、飽和NaCl 30mlを添加し、その後、水10mlとエーテル50mlを添加して反応を止めた。水相をエーテル300mlで2度抽出し、エーテル層を合併して水100mlで逆抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。反応生成物を精製するために、活性度IIIで、中性のアルミナ (メルク) 90を用いてサンプルを分離した。溶出溶媒としては、石油エーテル/ジエチルエーテル (2:1) を使い、その後石油エーテル/ジエチルエーテル (1:1) を用いた (原料は、石油エーテル/ジエチルエーテル (2:1) で完全に溶出され、生成物は、その後溶出された)。プロトンNMR解析により、単離した反応生成物の構造は、以下に示すものであることを確認した。

【化49】



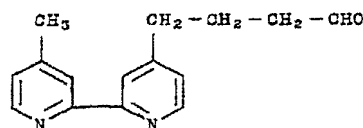
実施例27

4-(ブタン-1-アル)-4'-メチル-2, 2'-ビピリジンの合成及び精製

68

2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル)-プロピル]-1, 3-ジオキサラン2gを、1N HCl 50mlに溶解し、50℃で2時間加熱した。この溶液を冷却し、炭酸水素ナトリウムでpH7~8に調節し、クロロホルム100mlで2度抽出した。クロロホルム層を合併して少量の水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、ロータリーエバポレーターで蒸発すると黄色のオイル状物質を与えた。この黄色のオイル状物質を、酢酸エチル/トルエン (1:1) を溶出溶媒として用いるシリカゲルカラムで精製し、不純物はメタノールで溶出した。プロトンNMR解析 [δ 1.96-2.11 (m, 2H); 2.43 (s, 3H); 2.46-2.50 (t, 2H); 2.53-2.80 (m, 2H); 7.12-7.14 (m, 2H); 8.17-8.12 (br. s, 2H); 8.52-8.58 (m, 2H); 9.89 (s, 1H)] により、反応生成物の構造は、以下の通りであることを確認した。

【化50】



【0116】実施例28

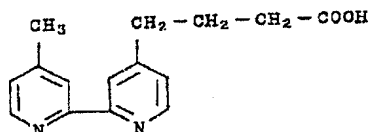
4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル) 酢酸の合成

4-(ブタン-1-アル)-4'-メチル-2, 2'-ビピリジン0.5g (2.0 mmol) を無水アセトン10mlに溶解した。この溶液に、微粉にした過マンガン酸カリウム225mg (KMnO₄; 1.42 mmol) を少量ずつ攪拌しながら添加した。この反応を薄層クロマトグラフィー (シリカ; 酢酸エチル/トルエン50:50) により追跡すると、アルデヒドが徐々に消失していき、R_f値の低いビピリジンが生成することが指摘された。

【0117】反応が完了した後に水を添加し、MnO₂を濾過し、Na₂CO₃ (水溶液) 少量ずつを用いて洗浄した。アセトンを回転式エバポレーターで蒸発し、残留物をCH₂Cl₂で抽出して非酸性ビピリジンを除去した。0.1NのHClを注意深く添加することにより水溶液を酸性としてpH4.8とした。このpHに達すると溶液は部分的に懸濁し、これよりも低いpHでは懸濁液は再び溶解した。この混合物を等量のCH₂Cl₂で5回抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、回転式エバポレーターで蒸発するとオイル状物質を与えるが、この物質は、減圧下では急速に固化した。この粗製の固体をクロロホルム:石油エーテルから再結晶して、白色の結晶を得た。融点:103.5℃-105.5℃; IR:1704 cm⁻¹。プロトンNMR解析は、以下の構造と一

致した。

【化51】

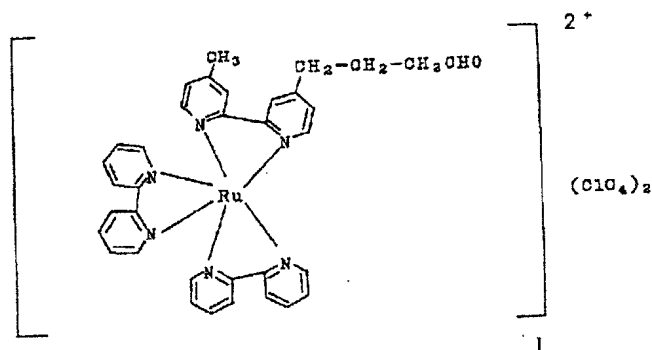


【0118】実施例29

ビス(2, 2'-ビピリジン) [4-(ブタン-1-アル)-4'-メチル-2, 2'-ビピリジン] ルテニウム 10
ム(II) 2過塩素酸塩：化合物Iの合成
エチレングリコール50ml中のルテニウムビピリジル
ジクロリド2水塩250mg (0.48mmol)
(Strem) を急速に加熱して沸騰させ、その後シリ
コン油浴(130℃)に浸した。生じた赤紫色〜オレンジ
色の溶液に、2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビ*

*ピリジン-4'-イル)プロピル]-1, 3-ジオキソ
ラン150mg (0.53mmol)のエチレングリ
コール10ml溶液を添加した。得られたオレンジ色溶
液を130℃で30分間攪拌し、冷却して室温とし、蒸
留水で1:1に希釈した。この溶液に、過塩素酸ナトリ
ウムの濃水溶液を添加すると、非常に微細なオレンジ
色の沈殿を生じた。この混合物を一夜冷蔵し、濾過し、沈
殿を水で洗浄した。この沈殿を湯に溶解し、過塩素酸を
添加して再結晶を行うと、鮮明なオレンジ色をした結晶
を生成した。その後、結晶を濾過し、冷水で洗浄し、乾
燥した。この再結晶操作をくり返すと、総量150mg
の鮮明なオレンジ色の結晶を与えた。NMR解析は、以
下の構造を示した。本実施例においては、上で同定した
化合物は、化合物Iであると見なされる。

【化52】

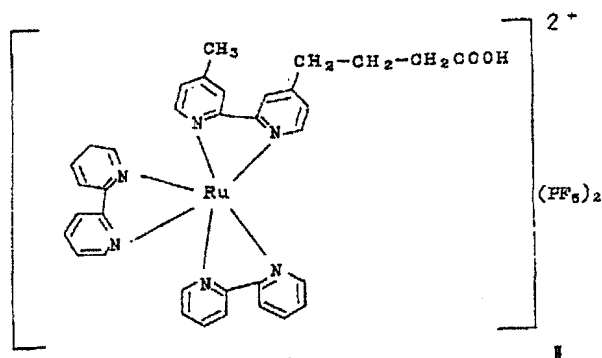


【0119】実施例30

ビス(2, 2'-ビピリジン) [4-(4-メチル- 30
2, 2'-ビピリジン-4'-イル)酪酸] ルテニウム
(II) ジヘキサフルオロフォスフェート：化合物II
の合成
4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル)
酪酸134mg (0.52mmol)を、水15
0mlに溶解した。この溶液をアルゴンで脱気し、ルテ
ニウムビピリジルジクロリド2水塩(Strem) 25
0mg (0.48mmol)を添加した。この混合物
をアルゴン気流下で4時間還流した。水を回転式エバポ
レーターで蒸発し、残留物を最少量の水に再溶解し、S 40

P-25-セファデックスイオン交換カラムにかけた。
水で不純物を溶出した後に、0.2MNaCl溶液を用
いて化合物を赤色帯として溶出し、NH4PF6の飽和
水溶液を添加することにより、ヘキサフルオロホスフェ
イトとして単離した。粗生成物を、熱アセトン〜ジエチ
ルエーテルから2度再沈殿させた。元素分析：計算値；
C, 43.80%；H, 3.36%；N, 8.76%。
測定値；C, 43.82%；H, 3.54%；N, 8.
55%。プロトンNMRの解析は、以下の構造と一致し
た。

【化53】



【0120】実施例31

N-[4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル)-ブチル]-フタルイミドの合成

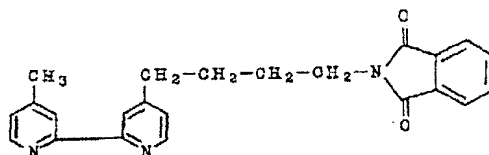
不活性なアルゴンの気流下に、乾燥テトラヒドロフラン (THF) 30 ml 及び乾燥ジイソプロピルアミン 7.65 ml (54.6 mmol) を、600 ml の三頸フラスコに、注射器を用いて攪拌しながら添加した。低位型ビーカーに入れたドライアイス-イソプロパノール混合物にフラスコを浸すことにより、この溶液を、 -78°C に冷却した。2.5 M n-ブチルリチウム 21.6 ml (54 mmol) をゆっくりとフラスコに添加した。得られた溶液を15分間攪拌し、4, 4'-ジエチル-2, 2'-ビピリジン 9.58 g (52 mmol) の乾燥 THF 300 ml 溶液を、カニユーレを介して、攪拌しながら1時間かけて滴下した。

【0121】生じた褐色の混合物をさらに -78°C で2時間攪拌し、1, 3-ジブromopropan 100 g (0.495 mol) を急速に添加し、得られた混合物を -78°C で1時間攪拌した。その後、この混合物を室温で2時間攪拌した。混合物の色調は、褐色から青、さらに黄色へと変化した。殆んど溶媒を回転式エバポレーターで蒸発し、水 200 ml を添加すると二層となった。濃塩酸を添加して pH を 0 に下げた。有機溶媒層を廃棄した。水層を 100 ml のエーテルで2度洗浄した。pH を 1~2 に上げた。赤色のオイル状物質を分離し、 CH_2Cl_2 に抽出した。この溶液を無水 Na_2CO_3 で乾燥した後に、殆んど CH_2Cl_2 を回転式エバポレーターで蒸発し、サンプルをシリカゲルカラムにかけた。クロロホルムでサンプルを溶出すると、淡黄色のオイル状物質を与えた。この物質は、一夜冷却すると結晶化した (12.37 g)。

【0122】この様にして合成した 4-(4-ブromobutyl)-4'-メチル-2, 2'-ビピリジンの粗結晶 4 g (13.3 mmol) を、その後フタルイミドカリ 2.46 g (13.3 mmol) のジメチルホルムアミド (DMF) 60 ml 懸濁液に添加した。その後、この混合物を約 50°C で2時間攪拌した。この混合物に CHCl_3 90 ml を添加し、さらに水 125 ml を添

加した、 CHCl_3 層を分離し、水層をクロロホルム 50 ml で2度抽出した。 CHCl_3 層を合併して水 50 ml で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、回転式エバポレーターで蒸発すると、淡橙色のオイル状物質を与え、この物質は一夜の間に固化した。この粗生成物をアセトン/エタノールから再結晶すると、白色結晶 (融点、 $114.5-117.8^{\circ}\text{C}$) 2.21 g (44.5%) を与えた。元素分析：計算値；C, 74.38%；H, 5.70%；N, 11.31%。測定値；C, 73.98%；H, 6.14%；N, 11.28%。IR：フタルイミドカルボニル伸縮 1771 及び 1704 cm^{-1} 。プロトン NMR の解析では、アロマティック共鳴 ($\delta 7.57-7.85$, m, 4H) と通常のビピリジル誘導体のシグナルを示した。これらのデータは、以下の構造と一致する。

【化54】



【0123】実施例32

テオフィリン-8-ブチリック-[4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-イル)-ブチル]アミド：化合物 I II I の合成

N-[4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル)-ブチル]-フタルイミド 370 mg (1 mmol) をエタノール 10 ml 中で泥状にし、包水ヒドラジン (720 mg, 1.4 mmol) で処理し、攪拌し、4時間還流すると、この間に固体はすべて溶解した。この反応の終末に向って、白色の沈殿が生成し始めた。冷却した後に、この反応混合物を 50% NaOH で塩基性とし、水 100 ml に注加した。溶液を得た後に Na_2CO_3 を添加し、生成物をオイル状物質として塩析した。 CH_2Cl_2 40 ml ずつを4回用いてアミンを抽出した。抽出物を CaSO_4 で乾燥し、濾過し、蒸発するとアミノビピリジン誘導体を無色のオイル状物質

として与えた(収量=0.135g; 56%)。4-[4-(1-アミノブチル)]-4'-メチル-2, 2'-ビピリジン1.34g (5.6mmol)及びテオフィリン-8-酪酸(1.18g; 4.4mmol)を室温で乾燥ピリジン10ml中に溶解した。この溶液に、ジシクロヘキシルカルボジイミド1.16g (5.6mmol)を添加した。室温で一晩攪拌を続けた。アルミナの薄層クロマトグラフィー(移動相=15%メタノール/クロロホルム)を行ったところ、R_f0.68の単一生成スポットを示した。沈殿したジシクロヘキシル尿素を濾過して除去し、ピリジンを留去すると固体を与えるが、これをエーテル中でトリチュレートし、濾過した(収量=2.13g; 99%)。

【0124】実施例33

ビス(2, 2'-ビピリジン) [テオフィリン-8-ブチリック-4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル)-ブチルアミド] ルテニウム(II)ジクロリド: Ru(II)-化合物III結合体の合成
上述の化合物III 175mg (0.357mmol)及びビス(2, 2'-ビピリジン) ルテニウム(II)ジクロリド2水塩154mg (0.296mmol)の混合物に、エタノール/H₂O (1:1, v/v) 40mlを添加した。この混合物を暗所で15分間アルゴンで脱気し、アルゴン気流下暗所で3時間還流すると、澄明なチェリーレッドの溶液を与えた。生じた澄明なチェリーレッドの溶液を室温に冷却し、回転式エバポレーターを用いて、37℃以下の暗所で溶液を維持しつつ溶媒を除去した。得られた残留物を約3mlのメタノールに溶解し、セファデックスLH-20クロマトグラフィーカラム(75cm×3cm)にかけ、約0.4-0.7ml/mlの流速で溶出した。鮮明な赤色のバンド(生成物)には、褐色の非蛍光バンド(不純物)と、2個の蛍光バンドが接近して続いていた。赤色の生成物バンドには、褐色の非蛍光バンドからの少量の不純物が混入していることが判明した。この混入物は、同様の条件下の2度目のセファデックスLH-20カラムにサンプルをかけることにより、生成物から分離した。回転式エバポレーターで溶媒を蒸発することにより赤色の生成物を得た。得られた固体物質を約1mlのメタノールに溶解し、約75mlのジエチルエーテル中で再沈殿させるとオレンジ色の粉末を与え、これを濾取した。

元素分析: 計算値; C, 54.51%; H, 5.72%; N, 13.99%; O, 10.47%; Cl, 6.44%。測定値; C, 55.04%; H, 6.35%; N, 13.18%; O, 10.62%; Cl, 6.68%。

【0125】実施例34-テオフィリンに対して特異的な抗体を用いたRu(II)-化合物III結合体により生ずるエレクトロルミネセントシグナルの変調

実施例33で述べたこのRu(II)-化合物III結合体を0.35Mフッ化ナトリウムを含むpH6.0の0.1Mリン酸緩衝液(PBF緩衝液)で最終濃度が150nMになるまで希釈した。テオフィリンに対し特異的なモノクローナル抗体(クローン番号9-49、腹水ロット番号WO399, cat no. 046)をKallestad Laboratories, Inc. (Chaska, MN)より入手した。このモノクローナル抗体をPBF緩衝液を用いて様々な濃度に希釈した(1ml中のタンパク質が21.9μgから700μgの範囲)。テオフィリンに反応しないもうひとつのモノクローナル抗体(対照MAB)をSigma (St. Louis, MO)より入手し、PBF緩衝液を用いて1ml中のタンパク質が21.9μgから700μgまでの様々な濃度に希釈した。テオフィリンの標準溶液をAldrich Chemical Co.より入手したテオフィリン(Milwaukee, WI, ネコ番号26-140-8, M. W. 180.17)を用いて調製した。テオフィリンはPBF緩衝液中に最終濃度が75μMとなる様に溶かし、アッセイに使用する為にPBF緩衝液で6μMにまで希釈した。エレクトロ化学ルミネセントの測定を実施するに先立ち250mMのシュウ酸と5%(v/v)のTriton-X100を含む溶液(ECI溶液)を反応混合物に添加した。測定は反応溶液を含む試験管に2つの白金ガーゼ電極を取り付けられる様に改良されたBertholdルミノメーターを用いて行なった。この電極をポテンシostatに接続し、エレクトロ化学ルミネセンスの測定は走査速度50mV/secで1.5から2.0ボルトまでこの電極間の印加電圧を変化させる事により実施した。この測定に使われたBertholdルミノメーターには高利得の赤感性光電子増倍管が付いていた。このルミノメーターの記録計への出力は10⁵counts/voltに合わせた。この測定値はX-Y-Y'記録計に記録され、このピーク高をエレクトロ化学ルミネセンスの測定値として用いた。この電極は測定と測定の間に0.1Mリン酸、0.01Mクエン酸、0.025Mシュウ酸、及び1%TritonX-100を含むpH4.2の緩衝液ですすぎ、この溶液中でこの電極に+2.2から-2.2ボルトの間の電流を60秒間パルスとして流し、続いて+2.2ボルトを10秒間流す事によりきれいにする。次にこの電極をこの溶液から取り出し、蒸留水中ですすぎ、水気を拭きとって乾かす。この実験は表XIVに概略を示したとおりに実施した。

【0126】対照のモノクローナル抗体の溶液、テオフィリンに対する抗体の溶液、又はPBF緩衝液を一組の試験管に注いだ(ステップ1)。この試験管にテオフィリン溶液又はPBF緩衝液を加えた(ステップ2)。この溶液を試験管を簡単に振る事で混合し、室温で25分間反応させた。その後Ru(II)-化合物III結合

体の溶液をこの試験管に加えた(ステップ3)。この試験管を振り、室温で15分間放置した。最後にこのEC L溶液100 μ lを各々の試験に添加し、上述の様にエ*

*レクトロ化学ルミネセンスを測定した。この結果は表XVに示した。

【表12】

表 XIV

エレクトロ化学ルミネセンスに関して抗体-Ru(II)-化合物

III共役物の相互作用が及ぼす効果を研究する為の実験計画

ステップ1 100 μ lの:	ステップ2 200 μ lの:	ステップ3 100 μ lの:
A. 対照モノクローナル 抗体(2.19 μ g から70 μ gまで) 或いは	緩衝液	Ru(II)-化合物 III結合体
B. 抗テオフィリン抗体 (2.19 μ gから 70 μ gまで) 或いは	緩衝液又はテオフィ リン	Ru(II)-化合物 III結合体
C. PBF緩衝液	緩衝液	Ru(II)-化合物 III結合体

【表13】

表 XV

Ru(II)-化合物III共役物のエレクトロ化学ルミネ

センスに対する抗体とテオフィリンの影響

抗体タンパク質 濃度 (μ g/試験管)	抗テオフィリン		
	対照MAB+ Ru(II)- 化合物III	抗テオフィリン MAB + Ru(II)- 化合物III	MAB + テオフィ リンRu(II)-化 合物III
ルミネセンスの測定値			
2.19	55.000	40.000	43.000
	55.000	41.000	57.000
4.38	57.000	22.500	37.000
	57.000	25.000	36.000
8.75	53.000	20.000	33.500
	50.000	22.000	30.500
35.0	43.000	13.500	17.500
	41.000	14.000	16.000
70.0	42.000	11.000	11.000
	37.500	12.000	12.500

【0127】重複試料のエレクトロ化学ルミネセンスを上
述した様に測定した。上の実験で用いたRu(II)

50 一化合物III結合体のエレクトロ化学ルミネセンスは
抗体を添加しない緩衝液中で測定した際57,200で

あった。緩衝混合液に対するバックグラウンドは5750であった。このデータはルテニウム化合物が付着したテオフィリン類似体、即ちRu(II)-化合物IIIと接触した際、特異的にテオフィリンを認識するモノクローナル抗体はそのエレクトロ化学ルミネセンスを減じるであろう事を示している。エレクトロ化学ルミネセンスの減少量はRu(II)-化合物III結合体の濃度を一定に保った場合、抗体の濃度に比例する。テオフィリンと反応しない抗体を使用する場合は抗体が高い濃度でもエレクトロ化学ルミネセンスはわずかに減少するだけである。このデータはまた、テオフィリンを抗テオフィリン抗体に接触させた後、Ru(II)-化合物III共役物を混合物に加えた場合、エレクトロ化学ルミネセンスの量はより大きくなる事も示している。この事はテオフィリンは抗体の結合に関してRu(II)-化合物III共役物と競合しその結果としてエレクトロ化学ルミネセンスを生じるRu(II)-化合物III結合体が大量に得られる。

【0128】実施例35-ホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイに基づいた血清中のテオフィリンのアッセイ

実施例34で述べた結果に基づいてテオフィリンに対するホモジニアスイムノアッセイ法を競合結合の型についての実施例33で述べたテオフィリンとこのRu(II)-化合物III結合体に対する抗体を用いて開発した。材料は0.1Mフッ化ナトリウムを含むpH6.0の0.1Mリン酸緩衝液を除き実施例34で述べた物と同じであった。このアッセイに対してはテオフィリンに対するモノクローナル抗体の濃度を特別に選択した。この抗体濃度は55 μ g/mlであった。このRu(II)-化合物III結合体の濃度は175nMに調整した。テオフィリンをヒト血清に最終濃度が1mlの血清当り2.5、5、10、20、及び40マイクログラムとなる様に加えた。アッセイは10 μ lの血清を290 μ lの抗テオフィリンモノクローナル抗体に加え、室温*

*で25分間放置する事により行なった。次に100 μ lのRu(II)-化合物III共役物を各々の試験管に最終濃度が35nMになる様に加え、この溶液を室温で15分間放置した。実施例34で述べたECL溶液を100 μ lずつ各々の試験管に注ぎ、この溶液のエレクトロ化学ルミネセンス特性を1.5~2.5ボルトの範囲を50mV/secで走査して先に述べた方法で測定した。このデータを第2図に示す。このデータは血清試料中のテオフィリン濃度とこの反応混合物より生ずるエレクトロ化学ルミネセンスの量との間に相関がある事を示している。この結果はテオフィリンのアッセイ開発の可能性を示している。これらの結果に基づけば、この技術に習熟した人は生物基質中の興味ある目的的分析物質を検知したり定量する為にホモジニアス エレクトロ化学ルミネセンス イムノアッセイを開発する事ができるであろう。

【0129】実施例36-ホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイに基づく溶血した血清、脂血症の血清、黄疸の血清、及び正常血清試料中のテオフィリンのアッセイと蛍光偏光法との比較

様々なタイプの血清試料中のテオフィリン濃度をホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイを用いて測定した。このアッセイの型は実施例33で述べたテオフィリンに特異的なモノクローナル抗体とRu(II)-化合物III結合体を用いた競合結合アッセイである。エレクトロ化学ルミネセンスの為に試薬と方法は先の実施例で述べられている。様々な血清試料中のテオフィリン濃度の測定に使われている蛍光偏光法をAbbott Laboratories (North Chicago, IL)より購入した自動TDX器機を用いて実施した。このアッセイには溶血した血清、脂血症の血清、黄疸の血清及び正常の血清を用い、この異常血清に対するデータは以下の表XVIに示す。

【表14】

表 XVI

ホモジニアス テオフィリン アッセイ潜在的に問題のある血清の特徴

血清	ファクターの濃度	正常値の範囲
溶血	12.4mg/dlヘモグロビン	0-3.2mg/dl
脂血症	405mg/dlトリグリセリド	10-190mg/dl
	196mg/dlコレステロール	120-200mg/dl
黄疸	10mg/dlビリルビン	0-1.5mg/dl

様々な量のテオフィリンを最終濃度が2.5 μ gテオフィリン/mlから40 μ gテオフィリン/mlの間になる様にこの血清試料に加えた。このホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイの結果を第3図に示す。各々の血清試料はテオフィリン濃度に関して蛍光偏光法でも分析した。このホモジニアス エレクト

ロ化学ルミネセント イムノアッセイと蛍光偏光法とで測定したテオフィリンの濃度を比較した。このデータは散布図としてプロットし、第4A~D図に示す。このデータの点を線型回帰により分析し、相関係数を計算した。この分析によりこの2つのアッセイの間には特に強い相関がある事が示されている。この相関係数(r)は

0.98から1.00であった。正常血清、溶血した血清、脂血症の血清試料に対する曲線の勾配は0.8から1.2の間であり、この事はこれらの血清試料からのテオフィリンの回収率が非常に高い事を示している。

【0130】テオフィリンを含め黄疸の血清試料から生じるエレクトロ化学ルミネセンスは他の血清試料に対するものより高いが、これは各々のテオフィリン濃度に於いて比例して高くなった。この事は第4D中に見る事が出来る。この相関係数はエレクトロ化学ルミネセンスと蛍光偏光を比較したデータ点に対して1.00である；しかし勾配は2.14である。この事は黄疸の血清試料中のテオフィリンの高い回収率を示している。これらの結果に基づいて、黄疸の試料中のテオフィリン濃度を既知の量のRu(II)-化合物結合体を黄疸の血清の一部に加える事により試料に対する標準曲線を描き、これを用いて測定することができるであろう。これらのデータはホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイは、異常な量のヘモグロビン、脂肪、及びビリルビンを含む血清試料中のテオフィリン濃度を測定する為に使用できる事を示している。ホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイはECL検出に於ける多能性、即ち生物分子のより高い濃度でより敏感な検出が出来るという理由から蛍光偏光法よりも優れている。

【0131】さらにホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイは入射光源が不必要で、電氣的励起のみが効率的な光の発生に必要な理由から蛍光偏光法よりも有利である。従ってエレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイには精巧な光学は必要でない。この測定原理は電気化学的刺激によって誘発される純粋に特異的な光子の放出であるので、このシステムの感度は本質的に蛍光偏光法より十分に高く、より幅広いダイナミックレンジが達成できるであろう。また、非常に多様な目的の分析物質の測定が蛍光偏光法よりもホモジニアスエレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイで可能である。これは生物分子の認識作用、即ち抗体-抗原相互作用により電氣的に刺激された化学ルミネセンスが敏感な変調を起こす事に因る。これらの結果に基づけば、この技術に習熟した者には異常な血清試料中の興味あるその他の目的の分析物質を検知する為のホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイを開発できる事がわかるであろう。

【0132】実施例37-ホモジニアス エレクトロ化学ルミネセンス イムノアッセイに基づく血清中のテオフィリンのアッセイ及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法との比較

様々な量のテオフィリンを最終濃度が2.5μgテオフィリン/mlから40μgテオフィリン/mlになる様にヒトの血清試料に加えた。各々の試料を次に2つの部分に分け、この試料のテオフィリン濃度をホモジニアス

エレクトロ化学ルミネセンス イムノアッセイで測定し、同じ血清試料に対してHPLC法で得られた結果と比較した。ホモジニアス エレクトロ化学ルミネセンス イムノアッセイに於けるアッセイの型はテオフィリンに特異的なモノクローナル抗体とRu(II)-化合物III結合体を用いた競合結合アッセイである。このアッセイの為に試薬と方法は先の実施例で述べられている。様々な血清試料中のテオフィリン濃度の測定に使われたHPLC法は以下に述べる。

【0133】テオフィリン(1,3-ジメチルキサンチン)をアセトニトリルで血清タンパク質を沈殿させる事により血清タンパク質から分離する。テオフィリンを含む上澄み液をWaters Associates Micro Bondapak C18カラム(3.9mm×30cm)を装備したHPLCシステムに流した。このクロマトグラムは10分以内に完全に分かれた。以下の試薬を使用した：酢酸ナトリウム(試薬用)、脱イオン水(Millipore Milli Qシステムにより精製)、アセトニトリル(HPLC用)、テオフィリン標準試薬、(Sigma)。血清タンパク質を沈殿させる為に用いた溶媒は14%(v/v)のアセトニトリルを含むpH4.0の20mM酢酸ナトリウム緩衝液とした。このHPLCの移動相の緩衝液は7%(v/v)のアセトニトリルを含むpH4.0の10mM酢酸ナトリウム緩衝液とした。流速は1.5ml/minとし、流出液は270nmにセットされているUV分光光度計でモニターした。このUV吸収検出器の感度は0.02吸光度単位フルスケール(AUFS)にセットした。気温は22℃から24℃の間であった。

【0134】血清中のテオフィリン濃度測定に関するホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイとHPLCアッセイの結果を図5に示す。データは散布図としてプロットされデータの点は線型回帰により分析された。その相関係数を計算した。相関係数(r)は0.98であり、これは2つのアッセイの間に強い相関がある事を示している。曲線の勾配は1.197であり、HPLCに基づいた標準的方法に比べてホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイの方がこの血清試料からのテオフィリンの回収率が優れている事を表わしている。このホモジニアスエレクトロ化学ルミネセント アッセイはHPLC法よりもスピード、感度、及び多数の試料を簡単に扱えるという点でより有利である。これらの結果に基づけば、この技術に習熟した者にはHPLCやその他同類の方法で検出できる分析対象物をホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイで検出する方法を開発できる事がわかるであろう。

【0135】実施例38-テオフィリン-ウシ血清アルブミン結合体の製法

テオフィリン-ウシ血清アルブミン(BSA)共役物を

テオフィリン-3-メチル-酪酸、テオフィリン-8-酪酸、及びテオフィリン-7-酪酸から以下の方法により調製した。50mgのBSAを1mlの0.15M NaHCO₃、pH9.0に溶解した。16mgのエチル3', 3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI) と11mgのN-ヒドロキシコハク酸塩 (NHS)、及びジメチルスルホキシドに溶かした17.8mgのテオフィリン-7-酪酸、又は20mgのテオフィリン-8-酪酸、又は20.9mgのテオフィリン-3-メチル-酪酸を別々に加えこの溶液を45℃で1~2時間加熱した。この溶液をBSA溶液に一滴ずつ加え1時間反応させた。BSAのテオフィリン結合体はSephadex G-25のカラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーでpH7.4の0.15M PBS/0.1%アジ化物を移動相とし、流速30ml/hrで分離精製した。

【0136】実施例39-テオフィリン-BSA Biomag粒子の製法

4mlのBiomag-アミン粒子 (Advanced Magnetic, Inc., Cambridge, MA) を0.008% Nonidet P-40 (NP-40) を含むpH7.4のリン酸緩衝食塩水 (Sigma) (PBS) 20mlで2~3回separate T-flask中で洗った。このBiomag wet cakeに5%のグルタルアルデヒドを含むPBSを10ml加えロータリーミキサーで3時間活性化させた。活性化されたBiomag粒子を上述の様に合計4回洗い、T-flaskに移し換えた。10mlのPBS/NP-40中の実施例38に述べた方法で調製されたテオフィリン-BSAを6.8mgこの活性化されたBiomag wet cakeに加えた。4℃で一晩反応させた。この活性化されたBiomag wet cakeを20mlの1%BSA/0.15M PBS/0.1%アジ化物 (pH7.4) で3回洗った。この際最初の洗浄はロータリーミキサーを用いて約30分間続けた。

【0137】実施例40-化合物I-抗テオフィリン結合体の製法

1. 1mlのマウス抗-テオフィリン モノクローナル*

*抗体 (Kallestad、ロット番号WO399; 4.6mg/ml) を10,000gで8分間遠心した。緩衝液は0.2M NaHCO₃、0.15M NaCl、でアジ化物を含んだpH9.0のものにAmicon Centricon30 concentratorを用いて取り換えられた (3000gで遠心された)。この抗体溶液は2mlに希釈され、3.2mgの化合物Iが加えられた。室温で2時間攪拌しながら反応させ、1mg/mlの濃度のNaBH₄水溶液を79μl加え、この溶液を30分間攪拌した。こうして得られた溶液を前もってトリス緩衝液で平衡化されたSephadex G-25のカラム (1.0cm×18.0cm) につけ、流速15ml/hrで流出させた。化合物I-抗テオフィリン結合体を含むフラクションを集め、透析チューブに移し、0.15Mリン酸塩/0.15M NaF (PBS)、pH6.9 (41) に対し透析した。

【0138】実施例41-不均質エレクトロ化学ルミネッセント アッセイに基づいた血清中のテオフィリンのアッセイ

免疫学的測定法のひとつの型を用いて、テオフィリンに対する不均質アッセイを化合物Iで標識された抗テオフィリン抗体とBiomag磁気粒子上に固定されたテオフィリンBSAを用いて開発した。この抗体濃度は20μg/mlであった。磁気粒子の濃度は1%固体 (wt/vol) であった。テオフィリンは1mlの血清に対し最終濃度が10及び40μgとなる様に加えた。このテオフィリン血清標準物は1%のBSAを含むPBF緩衝液 (リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、0.1M フッ化ナトリウム) で1000倍に希釈した。アッセイは、75μlの希釈された血清標準物を75μlの抗体が結合した化合物Iに加え、この溶液を室温で20分間反応させる事により実施した。次に50μlのテオフィリン-BSA-Biomag粒子を加え、この懸濁液を5分間放置した。この粒子を磁気的に分離し、上澄み液の100μlについて実施例48で述べる方法に従ってエレクトロ化学ルミネッセンスを測定した。

【表15】

テオフィリン濃度 μg/ml [†]	ECL *	BD	% CV
0	8,758	81	0.9%
10	11,078	368	3.0%
40	14,106	674	4.8%

* ECL 10秒間に対するカウント

† 希釈について補正されている

レクトロ化学ルミネセンスイムノアッセイを開発する事が出来るであろう。

【0139】実施例4 2-化合物II-ジゴキシゲニン結合体の製法

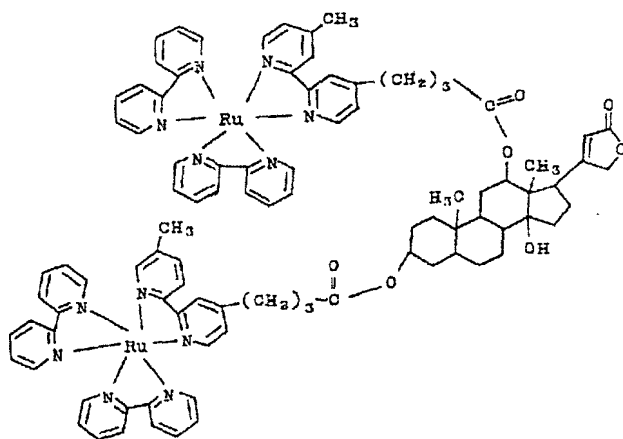
攪拌バーが付いた50mlの丸底フラスコに100.2mg (0.104mmol)の化合物II、41mg (0.105mmol)のジゴキシゲニン (Sigma) 及び28mg (0.136mmol)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)を加えた。この混合物に8-10mlの無水ピリジン (Aldrich Sure-Seal)を18ゲージの針を付けたシリンジで加えた。このフラスコに栓をし、テフロンのテープで封をして溶液が赤くなるまで穏やかに攪拌した。このフラスコはフードの中で攪拌しながら暗い状態で24時間放置し、この時6mg (0.015mmol)のジゴキシゲニンと20mg (0.097mmol)のDCCを加えた。この溶液には栓をし、暗い状態で室温に於いて攪拌した。翌日、ジシクロヘキシル尿素の沈殿は観察されなかった。さらに18mg (0.05mmol)のジゴキシゲニンと103mg (0.50mmol)のDCCを加えた。フラスコに再び封をし暗い状態でさらに攪拌を続けた。72時間後さらに103mgのDCCを加え暗い状態で3時間攪拌した。

【0140】この溶液に5-10滴のH₂Oを加え、次にこれをロータリーエバポレーターに移して赤い固体を*

*生じるまで暗い状態で乾燥させた。得られた赤い固体はアルミニウムホイルで覆い、デシケーター中でCaSO₄を用いて一晚乾燥させた。この乾燥させた固体を次に3-5mlのメタノールに溶かし、この混合物に約0.25gの無水で固体状態のLiClO₄を加えた。LiClO₄が溶けたら、この溶液をSephadex LH-20のカラム (75cm×19mm)にかけ、流速7-10sec/dropの範囲でメタノールにより流出させた。クロマトグラフィーが展開した際3つのバンドが確認された；第1の淡橙色 (赤色ルミネセント)のバンド (フラクション1)；第2番目の暗赤色のバンドでこれはこの反応の主生成物を示している (フラクション2)；及び第3番目の最初の2つのバンドの後ろに続いたバンドで (おそらく未反応の原材料から成り)これは捨てた。

【0141】バンド1と2はこのカラムで carousel して分離されたものなのでバンド2の中の橙色生成物をフラクション2 (15ml)のメタノール溶液を約300mlの無水ジエチルエーテルに滴下し攪拌した。得られた沈殿は15mlメデウムフリット上で吸引濾過により集め、15mlのジエチルエーテルで5回洗った。残ったエーテルを真空デシケーター中でCaSO₄を用いて一晚この化合物を乾燥させる事により取り除いた。この固体物質は以下の様に同定された：

【化55】



【0142】実施例4 3-化合物II-ジゴキシゲニン結合体のエレクトロ化学ルミネセンス (ECL)：抗ジゴキシシン抗体によるECLシグナルの変調

ジゴキシシンに対するモノクロナル抗体をイムノアッセイ緩衝液で以下の濃度に希釈した：1, 10, 50, 200, 400 µg/ml

化合物II-ジゴキシゲニン結合体 (50マイクロモル)をイムノアッセイ緩衝液 (0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0, 0.1Mフッ化ナトリウムを含む)で15

0nMに希釈した。ポリプロピレン製の試験管 (12mm×75mm)に入った200 µlのイムノアッセイ緩衝液に様々な濃度のジゴキシシン抗体を100 µlと化合物II-ジゴキシゲニン結合体を100 µl (150nM)加えた。試験管をボルテックス上で攪拌し、室温で15分間反応させた。反応の後、100 µlのECL溶液 (先述)を加えエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。

結果：

【表16】

特異的抗体の濃度

 $\mu\text{g}/\text{試験管}$ \bar{x}
ECL シグナル

0.1	108000
1	114000
5	82500
10	64000
20	52000
40	36000

30 nM化合物I I-ジゴキシゲニン結合体に対するECLカウントの総計=113666 (ピーク高)

【0143】試験管1本当り40 μg の濃度でシグナルの非特異的抗体による変調は67,000カウントでありジゴキシニンに対する特異的抗体が存在する時は36,000であった。第6図からわかる様に、化合物I I-ジゴキシゲニン結合体の固定された濃度に反応する際、抗ジゴキシニン抗体の濃度が上昇するとエレクトロ化学ルミネセントシグナルの変調が上昇する事が示された。この特徴は血清や血漿中のジゴキシゲニンの測定に対してホモジニアス エレクトロ化学ルミネセンスを基礎としたアッセイを開発に当り有益となるであろう。

【0144】実施例44-ホモジニアス ジゴキシニンアッセイ

実施例43で述べた結果に基づいてジゴキシニンに対するホモジニアス エレクトロ化学ルミネセント イムノアッセイをジゴキシニンに対する抗体と本化合物I I-ジゴキシゲニン結合体を用い競合結合型のアッセイ法を使って開発する事ができるであろう。使用されるであろう試薬は実施例43に記載されている。このアッセイに対してはジゴキシニンに対するモノクローナル抗体の特異的な濃度が選択されるであろう。この抗体濃度は1ml当り75~100 μg である。本化合物I I-ジゴキシゲニン結合体の濃度は5~15 nM (最終濃度)となるであろう。ジゴキシニン標準物がヒト血清に最終濃度が血清1ml当りジゴキシニン0.1、0.5、1、2、4、8、及び16 ngとなる様に加えられるであろう。このアッセイは10~30 μl の血清を300 μl の抗-ジゴキシニンモノクローナル抗体に加え、室温で30分間この溶液を放置する事により実施されるであろう。次に100 μl の本化合物I I-ジゴキシゲニン結合体を最終濃度が5~15 nMの範囲になる様に各々の試験管に加え、この溶液を室温で20分間放置する。先に述べたECL溶液を100 μl 各々の試験管に入れ先に述べた様にしてECLが測定されるであろう。

【0145】実施例45-ウアバイン-ウシ血清アルブミン結合体の製法

50 mgのウアバイン8水和物 (Aldrich) を5

mlの脱イオン水に溶かした。81 mgの NaIO_4 をこの溶かしたウアバインに加え、この混合物を室温で2時間反応させた。この反応はpHが5と6の間になるまで脱イオン水で平衡化したDowex IX-8イオン交換樹脂のカラム(5 ml)にこの混合物を通す事により止めた。廃液入れに入ってくる流出液が混合のサインを示したら酸化されて得られたフラクションを集めた。

20 100 mgの凍結乾燥されたウシ血清アルブミン (BSA) の結晶 (Sigma) を0.05%のアジ化物を含むpH7.4の0.1Mリン酸カリウム緩衝液5 mlに溶かした。この酸化されて得られた溶液にこのBSA溶液を一滴ずつ攪拌しながら加えた。こうして得られた溶液は室温で1時間反応させた後 NaCNBH_4 (Aldrich) を30 mg加えた。次にこの溶液を室温で一晩攪拌した。この溶液をポリエチレングリコール-8000で濃縮し(11 mlから4 mlまで)、遊離状態のウアバインと過剰の水素化ホウ素をこの溶液からSephadex G-25 (カラム=0.6 cm \times 37 cm; 溶離剤=0.1M K_2PO_4 /0.15M NaCl , pH7.5, 0.05% NaN_3)を用いて取り除いた。フラクション11-17を集め、そのタンパク質濃度を280 nmに於ける吸収を(希釈後に)測定する事により決定した。

【0146】実施例46-ウアバイン-BSA-セファロースの製法

セファロース4Bで活性化された臭化ジシアンを2 g sintered disk funnel上で400 mlの1M HCl を1回に50 mlずつ使って洗った。この樹脂を次に20 mlの0.1M NaHCO_3 、0.5M NaCl 緩衝液、pH9.0 (カップリングバッファー)で洗った。この樹脂をポリプロピレン製の容器に移し換えた後、15 mlのカップリングバッファーに溶かした30 mgのウアバイン-BSAを加えた。この活性化された樹脂をロータリー混合しながら2時間このウアバイン-BSAと共に反応させた。残った活性化部位は室温で2時間7 mlの0.5Mエタノールアミン (pH8.0)と反応させた。sintered disk funnelを用いてこの樹脂を以下

の溶液それぞれ100mlずつで洗った：カップリングバッファー；0.15MPBS；1mM HCl；カップリングバッファー；0.2%NP-40を含むPBS；及びPBS。この樹脂を再び11mlに懸濁し、十分な量のこの懸濁液を内径1.0cmのカラム（Pharmacia）に入れ総bed volumeが3.5mlになる様にした。

【0147】実施例47-抗ジゴキシン-化合物I結合物の製法とアフィニティー精製法

マウス抗ジゴキシンモノクローナル抗体（Cambridge Medical Diagnostics, cat no. 200M-014, ロット番号MA2507F）の1mg/ml貯蔵用溶液を450μl Amicon Centrificon30濃縮ユニットを用いて100μlにまで濃縮した。この濃縮物に0.2M炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH9.6を900μlと化合物Iを0.6mg加えた。反応（アミノ化）を室温で2時間行ない、その後30μlの0.1M NaBH₄（aq）（Sigma）を加えた。得られた溶液を1時間放置した。過剰の化合物I及びその他の生成物をこの抗体結合体からセファデックスG-25クロマトグラフィー（カラム=1.0cm ID×18cm；溶出剤=0.1Mリン酸塩緩衝食塩水）により分離した。試料は20ml/hrの流速で1mlずつのフラクションにして採り、280nmに於ける吸収を2.0AUS及び0.5AUSでモニターした。フラクション5、6、7、及び8を集め、予め洗ってあるウアバイン-BSA-セファロースアフィニティーカラム（3.5mlのカラムで内径1cm）にかけた。そして15ml/hrの流速で溶離させた。保持されていない物質が溶出した後、流速を20mlの溶出液が集まるまで30ml/hrに上げた。移動相のこの食塩水濃度は0.5Mに上昇し、さらに20mlをカラムから溶出させた。ウアバインに特異的な抗ジゴキシン-化合物I結合体は4Mと6MのKSCNを加える事により取り除かれた。抗ジゴキシン-化合物I結合体に当るフラクションを集め10mMリン酸塩緩衝食塩水（4リットル；pH7.4）、続いて0.1Mリン酸塩緩衝液に対して透析した。

【0148】実施例48-ジゴキシンに対する不均質エレクトロ化学ルミネセントイムノアッセイ

* 40

TCACCAATAAACCGCAAAACACCATCCCGTCCTGCCA
GT* でT* が5位の炭素が

【化57】

-CH=CH-CO-NH-(CH₂)₄-, -NH₂で修飾されたチミジンであるものを0.01Mリン酸緩衝液、pH8.7に溶かした。100μlのビス（2,2'-ビピリジン）〔4-（ブタン-1-α1）-4'-メチル-2,2'-ビピリジン〕ルテニウム（II）二過塩素酸塩（化合物I）（0.01Mリン酸カリウム

* 10mgの固体ジゴキシンを10mlのDMSO：H₂O（8：2）に溶かし、ジゴキシン濃度を1mg/mlとした（今後これを貯蔵用標準液と呼ぶ）。この貯蔵用標準液から0.1%BSA及び0.15M NaFを含むpH7.0の0.15Mリン酸緩衝液（今後ECL緩衝液と呼ぶ）を用いて以下の濃度の作業用標準液を調製した；80ng/ml、40ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml及び0ng/ml。75μlの抗ジゴキシン-化合物I結合体（1：90に希釈されている）及び75μlのそれぞれの標準液をガラス試験管にピペットで注ぎ、vortex上で混合し室温で20分間反応させた。50μlの予め洗浄されたウアバイン-BSA-Biomag粒子を各々の試験管に加え、vortexで混合した後室温で5分間反応させた。Biomag粒子を分離し、上澄み液をそれぞれ別の試験管に移した。100μlの上澄み液を400μlの0.125Mリン酸カリウム0.125Mクエン酸；32mMシュウ酸；1.25%Triton X-100と試験管中で混合した。この試料をBerthold instrumentに入れ、先に述べた様にエレクトロ化学ルミネセンスを測定した。但しその方法は開回路からの加電圧を2.2Vに切り換え、光子の計数を10秒間で積算する様に改変された。電極はリン酸クエン酸緩衝液を用いて以下の方法で測定の間に洗浄した：

- 電極に3秒おきに交互に-2.2Vと+2.2Vのパルスを送る。
- 電極を+2.2Vに10秒間保つ。
- 電極を脱イオン水ですすぎ、水気をとって乾かす。

この結果を第7図に示す。

【0149】実施例49-エレクトロ化学ルミネセンスを有する化学種によるDNAの標識づけ
エレクトロ化学ルミネセントを有する化学種によるDNAの標識づけを以下の2つの方法を用いて行なった。

合成A

1. 0A260の標準的に合成された38量体（MBI 38）

【化56】

緩衝液、pH8.7 300μl中に2.3mg）の溶液。内容物を攪拌し室温で一晩放置した。100μlの水素化ホウ素ナトリウム飽和水溶液をこの混合物に加え、この可逆的なイミンのシッフ塩基結合を非可逆的なアミン結合に変換させた。この反応は室温で2時間行なった。次にこの溶液を注意深く希酢酸で処理し、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを失活させた。この反応溶液を

P-2ゲル濾過のカラム(18インチ×1/2インチ)で予め0.1M酢酸トリエチルアンモニウム、pH6.77で平衡化されているものにかけて。このカラムはこの同じ緩衝液で溶出させ、2mlのフラクションを流速20ml/hrで集めた。フラクション9及び10に溶出したDNAは未反応のルテニウムビピリジル化合物と十分に分離された。この集められたDNA試料は典型的なUV吸収を示し、さらに450nmで励起すると620nmで蛍光の発光スペクトルを示した。この蛍光の発光はこのDNA試料中にルテニウムビピリジルの化学種が存在する事を示している。この生成物は単一の橙色の蛍光を発するバンドとしてポリアクリルアミドゲル電気泳動で移動する。この標識されたDNA(MBI38-化合物I結合体)の電気泳動による移動度はおよそ未標識のDNAと同じである。

【0150】合成B

本ルテニウム化合物をまず3mg、60μlの無水ジテチルホルムアミドに溶かし、これを94mgのジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)の存在下で200μlの無水DMF中の52mgのN-ヒドロキシスクシンイミドで処理する事によりN-ヒドロキシスクシンイミド誘導体に変換した。この反応は0℃で4時間行なった。沈殿したジシクロヘキシル尿素を遠心により取り除き、この上澄み液(200μl)を0.01Mリン酸緩衝液pH8.77中にアミノ結合したDNA(合成Aで述べた)を含む溶液(100μlの緩衝液中2A260)に加えた。この反応は一晩室温で行なった。かなりの量の固体が反応液中に現われたがガラスウールで濾過して取り除いた。この濾液を濃縮し、0.5mlの1M酢酸トリエチルアンモニウム(pH6.8)に溶かした。この反応混合液を次に合成Aで述べた様にクロマトにかけて。この標識されたDNAは合成Aで調製された材料について述べた様な全てのスペクトル上及び電気泳動上の特徴を示した。

【0151】実施例50-標識されたDNAの電氣的に発生させた化学ルミネセンスの特性

実施例49、合成Aで得られた標識されたDNA試料(MBI-化合物I)を用いてそのエレクトロ化学ルミネセンスの特性を研究した。様々な濃度の標識されたDNAを0.1Mクエン酸、25mMシュウ酸及び1.0%TritonX-100を含む0.1Mリン酸緩衝液、pH4.2、0.5mlに溶かし、改良されたBerthold Luminometerで測定した。第8図に様々なDNA濃度に対するエレクトロ化学ルミネセントシグナルの反応を示す。

【0152】実施例51-化合物Iで標識されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション実験

実施例50で述べた38量体に対する相補ストランドをABI model 380 B DNA Synthesizerを用いて合成し、これをMGEN-38と命

名した。このオリゴヌクレオチドへの化合物Iの共有結合的付着がMBI38オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性に影響を与えているかどうかを調べる為に、以下の実験を考案した。様々な濃度の標的フラグメント(MGEN-38)をGelman RPナイロンメンブランのシート上にスポットし、MBI38又はMBI38-化合物Iを固定し、エーテルでブローブした。両方のフラグメントをT₄ポリヌクレオチドキナーゼ及びガンマ³²P[ATP]で処理し、5'末端を³²Pで標識した。DNAと化合物Iで標識されたDNAのハイブリダイゼーション感度を比較した。

【0153】50ngから0.05ngまでの範囲の濃度のMGEN-38DNAをナイロンメンブランにスポットし、空気乾燥した。メンブランは1スポットに対し2枚ずつ用意した。このプロットをそれぞれ以下の溶液で2分間ずつ処理した：DNAを十分変性させる為に1.5M NaCl-0.5M NaOH；プロットを中和する為に1.5M NaCl-0.5M TRIS；最後に2X SSC。このプロットを80℃の真空オーブン中で2時間焼いた。ハイブリダイゼーションブローブは以下の要領で調製した：3μgのMBI38及びMBI38-化合物Iを10単位のT₄キナーゼと125μCiのガンマ³²P-ATPでキナーゼ処理した。DNAへの同位体の取り込み率を測定し以下に示した。

MBI38総カウント数 4.1×10⁶cpm/μl

取り込まれたカウント数 3.1×10⁵cpm/μl

取り込み率=75.6%

MBI38-化合物Iの総カウント数 3.2×10⁶cpm/μl

取り込まれたカウント数 2.6×10⁵cpm/μl

取り込み率=81.2%

【0154】プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの溶液をManiatis(24)に従って調製した。プロットは50μg/mlの仔ウシ胸腺DNAと共に53℃で4時間ハイブリダイゼーションした。次にこのプロットを10,000,000cpmの各々のブローブを含むハイブリダイゼーション溶液に入れた。そして53℃で一晩(12時間)ハイブリダイゼーションさせた。翌日このプロットを以下の様に洗浄した：

-53℃の2×SSC+0.1%SDSで15分間ずつ2回

-0.2×SSC+0.1%SDSで2回(上と同様に)

-0.16×SSC+0.1%SDSで2回(上と同様に)

このプロットを次に空気乾燥し-70℃でKodak X-omatフィルムにさらした。このX線分析(第9図参照)からMBI38とMBI38-化合物Iのプロープの間には非常に似たハイブリダイゼーションのパターンが見られる事がわかった。両方の場合に於いて5ngの標的に対するプロープのハイブリダイゼーションが観察され、最低0.05ngの標的DNAに至るまでわずかなハイブリダイゼーションの痕跡が認められた。陰性対照のDNA(50ngスポットしたファージラムダDNA)に対してはこのプロープによるハイブリダイゼーション活性は検出されなかった。

【0155】実施例52-化合物Iで標識されたDNAプロープのハイブリダイゼーションの特異性に関する実験

幾つかのE. coli及び非E. coli株からゲノムのDNAをManiatis(24)の方法に従って分離した。使用した生物は:

E. coli EC8株-天然分離株
E. coli PCIA株-腸管病原性株
E. coli 10H07株-毒素原性株
E. coli EC50株-天然分離株
E. coli B株-実験用株
E. coli K12株-実験用株

Enterobacter aerogenes エンテロバクター・エロゲネス

Citrobacter freundii シトロバクター・フロインディイ

Salmonella paratyphi B サルモネラ・パラチフィB

Salmonella potsdam サルモネラ・ポツダム

上述の株から得られたDNAを3μgずつ重複してGelman RPナイロンメンブラン及びS&Sニトロセルロースメンブラン上にスポットした。陰性対照として50ngのファージラムダDNAをスポットした。陽性対照は50ngから0.5ngの範囲の様々な濃度の相補ストランド、MGEN-38とした。このプロットは実施例51で述べた方法により調製し処理した。このプロープ用DNAは放射性を取り込ませる為に125μCiのガンマ32P-ATPと共にT4キナーゼ処理された3.8μgのMBI38-化合物Iフラグメントから構成された。

【0156】MBI38-化合物総カウント数

-3.35×10⁶cpm/μl

取り込まれたカウント数 -1.50×10⁶cpm/μl

取り込み率 -44.7%

このアッセイの為に2,600,000cpmの活性を各々のフィルターをプロープする為に用いた。このハイブリダイゼーション溶液、条件、洗浄溶液及びプロトコ

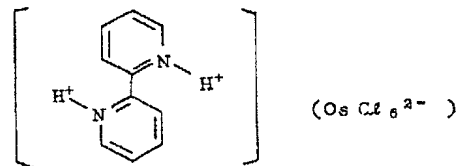
ルは実施例51で述べたものと同様のものを用いた。このプロットのX線フィルム(第10図)はそれぞれ適宜反応させた陽性及び陰性対照を示している。ラムダDNA(50ng)ではハイブリダイゼーション活性は検出されず、最低0.5ngの濃度までMGEN-38の相補配列に対し強いハイブリダイゼーションが観察された。これらの結果は感度に関する実験の結果と総合的に一致するものである。

【0157】実施例53-2,2'-ビピリジニウムヘキサクロロオスミウム酸塩(IV)の製法

1.01gのヘキサクロロオスミウム酸(IV)アンモニウム、(NH₄)₂OscCl₆、(Alfa)(1.00等量)を50mlの3N HCl(aq)に70℃で溶かした。この熱せられ、攪拌された溶液に3N HCl(aq)に溶かした2,2'-ビピリジンを一滴ずつ加えた。赤い塩、

【化58】

20



(今後(bpyH₂)²⁺OscCl₆²⁻と呼ぶ)で分子量562.2g/moleがこの溶液から沈殿した。沈殿はこの溶液を0℃の氷浴で2時間冷却する事により完了した。生成物をglass fritted filter上で吸引濾過により集めた。この沈殿物を連続的に5~10mlの氷冷した3N HCl(aq)と水で洗った。最後に20mlの無水ジエチルエーテルで洗った後、この生成物を真空下70℃で48時間乾燥させた。収量=1.01g橙色粉末((NH₄)₂OscCl₆に基づいた収率78%)。この生成物はさらに精製する事なく使用した。

【0158】実施例54-2,2'-ビピリジンテトラクロロオスミウム酸塩(IV)の製法

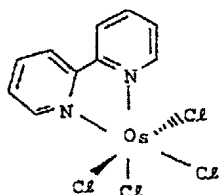
実施例53で調製した(bpyH₂)²⁺(OscCl₆)²⁻塩0.9g(1.60mmol)をバイレックスの試験管に量り取る。この試験管をアルゴンの出入口と温度計(最大目盛400℃)の付いたバイレックスの煙管に入れた。この装置全体を煙管に入れアルゴンを流し込んだ。この炉を加熱し、温度を270-300℃に上げた。反応の間を通してアルゴンを穏やかに管に流した。このアルゴンの出口を反応の間に生成したHClを実験室外へ排気する為にfumeフード下に向けた。温度が270℃に近づくにつれ、反応物の熱分解が開始した。この固体からHClガスが発生するのが観察された。30分間にわたり激しくHClが発生するのが観察され、その後しだいに鎮静化し始めた。6時間後、オーブンを止め、試料を室温まで冷却した。この生成物、

50

93

(bpy) OsCl₄、細かく分かれた茶褐色の固体を12時間、攪拌された3N HCl (aq) 溶液中に懸濁し、続いて6時間攪拌された無水ジエチルエーテル中に懸濁する事により精製した。glass fritted filter上で吸引濾過する事によりこの生成物を分離した結果、2, 2'-ビピリジンテトラクロロオスミウム酸塩 (VI) が0.75g (95%) 収穫された。これを今後 (bpy) OsCl₄と呼ぶ。(MW = 489.3 g/mole)。

【化59】



この生成物はさらに精製する事なく使用した。

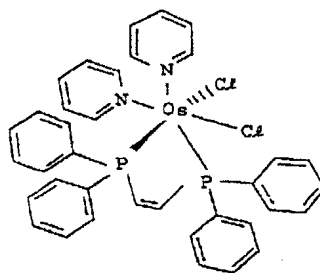
【0159】実施例55

シスー (2, 2'-ビピリジン) [シスービス (1, 2-ジフェニルホスフィノ) エチレン] -ジクロロオスミウムの合成

攪拌子と還流冷却器を付けた50mlの丸底フラスコに、実施例54に於いて合成した (bpy) OsCl₄ 230mg (0.47mmol) とシスービス (1, 2-ジフェニルホスフィノ) エチレン (DPP-ene) 465mg (1.17mmol) を添加した。ジグライム25mlを添加し、内容物をアルゴン気流下で5時間還流した。濃緑-黒色の溶液をアルゴン気流下で室温に冷却し、200mlのビーカーに移し入れた。無水ジエチルエーテル80mlを加えると濃緑色の沈殿を与えた。この沈殿をガラスフィルター (中程度の孔) 上に吸引濾過により収集し、20mlずつの無水ジエチルエーテルで5回洗浄した。この沈殿をその後CH₂Cl₂ 15mlに溶解すると濃緑色の溶液を与えた。この溶液をガラスフィルター (中程度の孔) を通して自然濾過して約300mlの攪拌している無水ジエチルエーテル中に注入した。灰色-緑色のシスー (2, 2'-ビピリジン) [シスービス (1, 2-ジフェニルホスフィノ) エチレン] -ジクロロオスミウムII錯体、これ以後は、シスー (bpy) (DPP-ene) OsCl₂と記述する、の沈殿が生じた。この錯体をガラスフィルター (中程度の孔) 上に吸引濾過して収集した。生成物を速かに20mlの冷1:2v/vエタノール/水で洗浄し、その後30mlずつのジエチルエーテルで7回洗浄した。スレート灰色の粉末を、真空デシケータ中CaSO₄を用いて一夜乾燥した。

【化60】

94



10

収量: 240mg ((bpy) OsCl₄; 分子量=814.4 g/moleに基づいて63%)。この生成物は、これ以上精製しないで使用した。

【0160】実施例56

(2, 2'-ビピリジン) [シスービス (1, 2-ジフェニルホスフィノ) エチレン] {2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル) プロピル] -1, 3-ジオキソラン} オスミウム (II) ジクロリドの合成

攪拌子と還流冷却器を装備した100mlの丸底フラスコに、実施例55で合成したシスー (bpy) (DPP-ene) OsCl₂ 129mg (0.158mmol) と2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル) プロピル] -1, 3-ジオキソラン、即ちbpyoxal, 0.3g (1.0mmol) を添加した。これにエチレングリコール15mlを添加した。この懸濁液をアルゴン気流下に3時間還流した。室温に冷却した後、水10mlをフラスコの内容物に添加した。水に入れたSP-セファデックスC-25イオン交換樹脂のカラム (30cmの高さ×19mm内径) を調製した。反応フラスコの内容物をカラムにかけた。カラムをH₂O (約500ml) で溶出してエチレングリコールと過剰のbpyoxal配位子を除去した。0.25M NaCl (水) 溶液で溶出して淡黄色の小バンド (長波長のUV光下ではオレンジ色の蛍光) を分離し、その後非蛍光のオリブグリーンのバンドを分離した。これらのバンドは、反応の副生成物であることを示した。それらの同定は行わず、廃棄した。これらのバンドをカラムから除去すると同時に、0.5M NaCl (水溶液) による溶出を始めた。最初のオレンジ色蛍光を有するオレンジ色のバンドは、必要とする生成物の塩化物塩である (2, 2'-ビピリジン) [シスービス (1, 2-ジフェニルホスフィノ) エチレン] {2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル) プロピル] -1, 3-ジオキソラン} オスミウム (II)、これ以後は (bpy) (DPP-ene) (bpyoxal) OS (II) 2+と記述、であると同定した。この物質は、テイリングした黄色バンド (緑色蛍光) と褐色バンド (非蛍光) から純粋に分離した。

50 【0161】(bpy) (DPP-ene) (bpyox

95

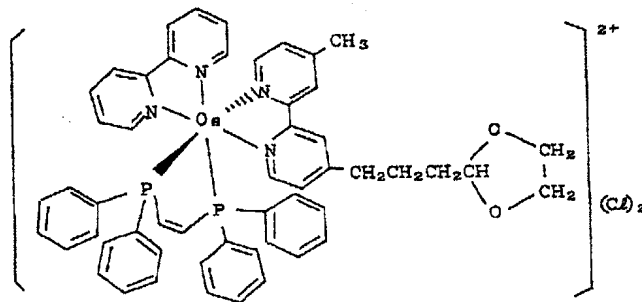
a1) Os (II) $2+$ を含む分画中の溶液量を、回転式エバポレーターで蒸発して50mlとした。その後濃NaCl水溶液を50mlずつの CH_2Cl_2 で3回抽出した。 CH_2Cl_2 抽出液を合併し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、ヒダ折りの濾紙で自然濾過した。赤色の CH_2Cl_2 溶液を回転式エバポレーターで蒸発して濃縮し10mlの容量とした。 CH_2Cl_2 溶液を、良く攪拌した200mlの石油エーテルにゆっくりと滴下することにより、オレンジ色の固体として錯体を単離した。沈殿した錯体をガラスフィルター（中程度の孔）上に吸引濾過して収集した。生成物を、15mlずつのジエチルエーテルで3回洗浄した。生成物を真空デシケーター*

96

*中 CaSO_4 により一夜乾燥した。収量：(bpy)·(DPPene) (bpyoxal) Os (II) $2+$ (Cl^-) $2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を110mg (シス-(bpy) (DPPene) OsCl_2 に基づき63%)。生成物は2水塩であり、分析的に純粋である： $\text{C}_{57}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_4\text{P}_2\text{Cl}_2\text{Os} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分子量=1109.59 g/mole)。

理論値：C, 55.20%; H, 4.87%; N, 5.05%; O, 5.77%; Cl, 6.39%。測定値：C, 56.03%; H, 5.18%; N, 4.88%; O, 6.87%; Cl, 7.07%

【化61】

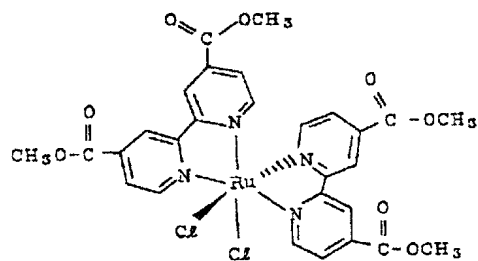


【0162】実施例57

シス-ジクロロビス-〔4, 4'-カルボエトキシ〕-2, 2'-ビピリジン〕ルテニウム (II) の合成
攪拌子と還流冷却器を装備した250mlの丸底フラスコに、シス-テトラ- (ジメチルスルホキシド) ジクロロルテニウム (II) ($\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$) 750mg (1.55 mmol) とエチレングリコール 100mlを添加した。フラスコの内容物をアルゴン気流下に軽く沸騰させ、(4, 4'-カルボメトキシ)-2, 2'-ビピリジン756mg (3.09 mmol)を添加した。アルゴン気流下の加熱を5分間継続した。オレンジ色の溶液は、褐色/黒色となり、リチウムクロリド0.75gとエチレングリコール50mlを添加した。この溶液をさらに10分間加熱した。室温に冷却した後、混合物に約100mlの H_2O を添加した。この混合物を、200mlずつの CH_2Cl_2 で5回抽出した。 CH_2Cl_2 抽出液を200mlずつの水で6回洗浄した。洗浄する毎に水層を(赤色の)蛍光についてテストし、水層に蛍光が検出されなくなる迄は、必要があれば洗浄を続けた。 CH_2Cl_2 抽出液を無水 Na_2SO_4 で乾燥した。生成物の CH_2Cl_2 溶液を蒸発し、攪拌している10倍量の無水ジエチルエーテルに滴下することにより単離した。沈殿した生成物を吸引により濾取し、30mlのジエチルエーテルで1度洗浄し、真空デシケーター中で CaSO_4 により一夜乾燥した。収率=25%濃いメタリックグリーン結晶。この生成物は、分析的に純粋である。

理論値：C, 44.57; H, 4.01; N, 7.43; Cl, 9.40; O, 21.21。測定値：C, 44.16; H, 3.72; N, 7.11; Cl, 9.53; O, 20.15。分子量=754.5 g/mol

【化62】



【0163】実施例58

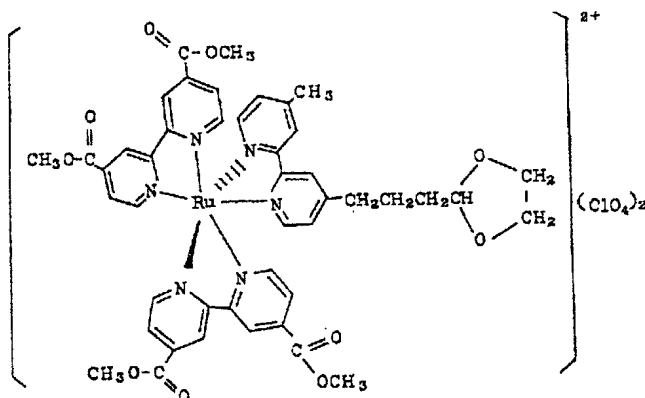
ビス〔(4, 4'-カルボメトキシ)-2, 2'-ビピリジン〕2-〔3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-イル)プロピル〕-1, 3-ジオキソランルテニウム (II) 2過塩素酸塩の合成

ビス(4, 4'-ジカルボメトキシ-2, 2'-ビピリジン)ルテニウム (II) ジクロリド250mg (0.33 mmol) のメタノール/水 (1:1) 50ml溶液に、2-〔3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル)-プロピル〕-1, 3-ジオキソラン (bpyoxal) 105mg (0.37 mmol) を添加し、この混合物をアルゴン気流下に12時間還流し

た。この溶液を冷却し、70%HC1O₄ 0.5mlを添加した。メタノールをゆっくりと蒸発した。沈殿した赤色結晶を濾取し、少量の冷却した水で洗浄し、ついでエタノール及びエーテルで洗浄し、真空で乾燥した。ビス(4, 4'-ジカルボメトキシ-2, 2'-ビピリジ

*ン) ルテニウム(II) ジクロリドと4-(4-メチル-2, 2'-ジピリジン-4'-イル)-酪酸又は4, 4'-メチル-2, 2'-ビピリジンから錯体を合成するために、同様の方法を使用した。

【化63】



【0164】実施例59-ヒトIgGの化合物Iによる 標識づけ

2mlのヒトIgG (2.5mg/ml) を2リットルの0.2M炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH9.6に対し4℃で一晩、穏やかに攪拌しながら透析した。化合物Iを存在するタンパク質 (2.7mg/100μlジメチルホルムアミド) に対して100molar過剰に調製し、溶かした。この透析されたタンパク質を一滴ずつtag-aldehydeに加えた。この間2時間、溶液を室温で穏やかに攪拌した。タンパク質に対し100molar過剰の水素化ホウ素ナトリウム (脱イオン水に溶かした1.24mg/ml溶液100μl) をこの溶液に加え、室温でさらに30分間穏やかに攪拌を続ける。この結合体を室温で0.2M Tris, pH8.0で平衡化したセファデックスG-25カラム (1.0cm×18.0cm) にかけて、溶出液を280nmでモニターした。ボイドボリュームのピークを集め、合わせて2リットルのTris緩衝液に対し透析した。この結合体に対し標準的なELISA法で免疫学的活性をテストし、使用時まで4℃で貯蔵した。

【0165】実施例60-Biomag/ヤギ抗ヒト IgG粒子の製法

5%Biomag-amine terminated 粒子 (Advanced Magretics, Cambridge, MA) を2.5ml清浄なT-フラスコに入れ、リン酸塩緩衝食塩水 (PBS) で5回洗った。このWet cakeを12.5mlの5%新しいグルタルアルデヒド (Sigma) に再懸濁し、外界温度で3時間十分に回転させた。このWet cakeを別のT-フラスコに移しPBSで3回洗浄した。この活性化された粒子を12.5mlのPBSに再び懸濁し、15

20 mlの遠沈管に移した。この懸濁液に2mlのPBSに溶かした12.5mgのヤギ抗ヒトIgG (H+L)

(Jackson Labs) を加えた。この管を室温で3時間十分に回転し、次に4℃で一晩回転させる。翌日この粒子を1% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSで2回洗浄し、次に0.1% BSAを含む12.5mlのPBS中で4℃で使用時まで貯蔵する。

【0166】実施例61-Biomagの磁気に基づく 粒子アッセイを用いた偽ホモジニアスヒトIgGエレクトロ 30 化学ルミネッセンスアッセイ

化合物I-ヒトIgG結合体を0.1% BSAを含む0.15Mリン酸緩衝液で1:50に希釈し、1本の試験につき250μlずつ入れた。希釈剤 (上述と同様PBW/BSA) を150μlずつ試験管に注ぎ、次に様々な希釈率の目的の分析物質 (ヒトIgG) 又は希釈剤 (陰性対照) を加えた。さらに非特異的目的の分析物質 (ヤギ抗ウサギIgG) を特異性のアッセイをチェックする為に試験管数本に入れた。ヤギ抗ヒトIgG (H&L) と結合した1%Biomagを50μl各々の試験管に加えた。この試験管はVortex上で混合され、室温で穏やかに振盪しながら15分間反応させた。この粒子を溶液から磁氣的に除去し、得られた上澄み液100μlをBerthold管に移し、ここに400μlのクエン酸塩-シュウ酸塩-Triton X-100溶液を加えた。この管をVortex上で混合し、R-268光電子増倍管及び直径0.29インチの輪状の52ゲージ二重白金メッシュ電極が付いた改良型Bertholdルミノメーターで測定した。この電極は、ポリカーボネートの支持体で覆われ、直径0.01インチの白金線/銀ペイント・コンタクトを介して電圧

源に接続されている伝導性ペイントによって支持されている。加電圧は+1.4から+2.15Vまでステップして、この間10秒間の積算をした。測定と測定の間にはこの電極を脱イオン水ですすぐ事により電気化学的に清浄にし、次にシュウ酸とTriton X-100を含む0.1Mリン酸塩-クエン酸塩緩衝液に浸漬し、加電を-2.2Vから+2.2Vまで(各々の電圧で3秒間)2分間及び20秒間ステップし、+2.2Vのpotentialで10秒間保持した。この電極を洗浄液から取り出し、脱イオン水ですすぎ、水気を吸い取って乾かした。この方式に於いてはエレクトロ化学ルミネセントシグナルは目的的分析物質の濃度に直接比例した。

【0167】実施例62-ビス(2,2'-ビピリジン)マレイミドヘキサ酸、4-メチル-2,2'-ビピリジン-4'-ブチルアミドルテニウム(II)二過塩素酸塩:化合物IVの製法

実施例32に記載されている方法で500mg(1.35×10⁻³mol)のフタルイミドから調製した4-[4-(1-アミノブチル)]-4'-メチル-2,2'-ビピリジンを無水ピリジンに0.313g(1.48×10⁻³mol)のマレイミドヘキサ酸と0.306g(1.48×10⁻³mol)のDDCと共に溶解した。一晩攪拌した後、ジシクロヘキシル尿素を濾過により除去し、ピリジンを真空下で蒸発させた。この残留物をカラムクロマトグラフィー(活性IIアルミナ、5%MeOH/CH₂Cl₂)で精製し、精製された生成物を得た。収量:0.56g(95%)。100mg(2.3×10⁻⁴mol)のマレイミドヘキサ酸、4-メチル-2,2'-ビピリジン-4'-ブチルアミド及び100mg(2.06×10⁻⁴mol)のビス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム二塩化物二水和物を50mlのエタノール/水(1:1)に溶かし、アルゴンで脱気して4時間還流した。得られた透明の橙色溶液を25mlの固体過塩素酸ナトリウム、25mlのエタノール、及び25mlのアセトンで希釈し、真空状態でゆっくりと蒸発乾固させた。乾固したら、さらに25mlの水と25mlのアセトンを加え、この溶液を約15~20mlになるまでロータリーエバポレーターで濃縮した。沈殿した固体を集め水で洗い乾燥させた。この試料は1:9メタノール/クロロホルムの溶媒系でアルミナの調製用TLCで精製した。ここで速く展開してきたバンドをプレートをかき取り、本化合物をメタノール/クロロホルム(1:1)中で攪拌する事により溶離させて分離した。アルミナを取り除く為に濾過した後、橙色の溶液を蒸発乾固させ86.7mgの精製された化合物を得た(72%)。この構造はNMRにより確認された。

【0168】実施例63-化合物IVによるhCGペプチドの標識づけ

2mgのヒト絨毛膜ゴナドトロピン(hCG)ペプチド

(#109-145, JP141, Vernon Stevens, Ohio State University)を1mlの0.15Mクエン酸緩衝液、pH6.0に懸濁し、1.13mgの化合物IVは300μlのジメチルホルムアミドに溶かした。このペプチド溶液を一滴ずつ1分間以上かけて化合物IV溶液に加えた。この溶液を室温で1時間穏やかに攪拌した。次にこの試料を、室温で0.2M Tris塩基、pH8.5で流速15ml/hrで平衡化されたBio-Gel P-2カラム(Bio-Rad; 1cm×45cm)にかけ、溶出液を280nmでモニターした。このボイドボリュームを集め、合わせて、室温で50mM Tris-HCl、pH7.0で平衡化されたQAE-Sephadex A-25カラム(Pharmacia; 1cm×10cm)にかけた。これは未標識の全てのペプチドを取り除く為に行なった。(この未標識のペプチドは陽性にチャージした樹脂に吸着され、プラス電荷の標識されたペプチドはそのままカラムを通過する。この溶出液は280nmでモニターされ、最初の主なピークを集め凍結乾燥により濃縮した。乾燥させた固体を再び最小量のPBFに懸濁した。このhCGペプチド-化合物IV結合体は使用時まで4℃で貯蔵された。

【0169】実施例64-DEAE AFFI-Gel Blueクロマトグラフィーによるウサギ抗hCGペプチドの精製法

4mlのDEAE AFFI-Gel Blue(Bio-Rad)をクロマトグラフィー用のカラム(1cm×10カラムサイズ)に注ぎ、室温で0.028M NaClを含む0.2M Tris-HClを用い流速40ml/hrで1時間かけて平衡化した。この流速を20ml/hrに下げ、予めこのカラム緩衝液に対し透析されたウサギ抗-hCGペプチド(anti 109-145, Vernon Stevens, Ohio State University)を1mlこのカラムにかけた。1mlずつのフラクションを集め、溶出液は280nmでモニターした。ボイドボリュームのピークを集め、数回の実験分を合わせ、ポリエチレングリコール6,000(Sigma)で囲まれた12K MWC O透析サックにこの溶出液を入れる事により濃縮した。この抗体について標準的なELISA法を用いて免疫学的活性をテスト、HPLCにより純度をテストした。HPLCの結果、ひとつの大きなピークを得、これは純粋で活性のある製剤である事を示している。

【0170】実施例65-精製されたウサギ抗hCGペプチドに対するhCGペプチド-化合物IV結合体の滴定:エレクトロ化学ルミネセンスシグナルの変調

hCGペプチド-化合物IV結合体を0.1Mクエン酸PH6.2を含む0.1Mリン酸緩衝液で希釈した。この混合物の一部をmicrofuge管に入れた。予め精製された抗ペプチド抗体を様々な濃度に希釈し、この

管に加え、Vortexで混合した後室温で1時間反応させた。エレクトロ化学ルミネセントを測る直前に、この一部をシュウ酸とTriton X-100 (Sigma)の入ったBerthold管に移した。この管をVortexで混合し、R-268光電子増倍管を用い、二重白金メッシュの電極を持つBerthold luminometerでSweepモード(+1.5から+2.5Vまで50mV/secで3回走査し、2回目の走査のピーク高を測定値とする)を使って測定した。測定の間この電極を電気化学的に清浄にした。最初にこれを脱イオン水で洗い、次にこれを25mMのシュウ酸塩と1%のTriton X-100を含むpH 6.1の0.1Mリン酸塩-クエン酸塩緩衝液に浸漬した。加電圧は各電圧に於いて3秒間、+2.2Vと-2.2Vの間を1分間及び50秒間スイッチを入れ、+2.2Vで10秒間保持した。次に電気を切り、洗浄液から電極を取り出し脱イオン水ですすぎ、水気を吸い取って乾かした。この結果はエレクトロ化学ルミネセントシグナルはこのペプチドに対する抗体の濃度に直接比例するという一般的傾向を示した。この事はエレクトロ化学ルミネセンスで標識された分析対象物が抗体と接触するとエレクトロ化学ルミネセンスシグナルが落ちるその他の実験とは対照的である。

【0171】実施例66-エレクトロ化学ルミネセンスシグナルの出力: Ru(II)-化合物III結合体の安定性に関するデータ

Ru(II)-化合物III共役物を1%の正常なヒト血清(NHS)を含むか或いは含まない0.1Mリン酸塩-クエン酸塩緩衝液、pH6.1で300nMまで希釈した。各々の緩衝液の種類のうちひとつを4°、20°、30°、及び50°でインキュベートし、3、4、及び5日目に試料を採取した。この試料は室温と平衡状態にし、そのエレクトロ化学ルミネセンスシグナル出力を測定した。400μlの試料を試験管内で100μlの125mMシュウ酸-5%Triton X-100と混合し、浜松R-268光電子増倍管と二重メッシュ白金ガーゼ電極の付いた改良型Bertholdルミノメーターに入れた。測定は加電圧を+1.5Vから+2.5Vまで50mV/secで3回スイープし、2回目のピーク高を記録し、エレクトロ化学ルミネセンスのカウントに変換する事により測定した。測定の間、電極を電気化学的に清浄にした。脱イオン水ですすぎ、電極を25mMシュウ酸塩と1%Triton X-100を含む0.1Mリン酸塩-クエン酸塩緩衝液に浸漬し、-2.2Vから+2.2Vまで3秒間の休止をして、各電圧1分間及び50秒間、電圧を脈送した。電圧を+2.2Vで10秒間止め、次に取り除いた。電極を洗浄液から取り除き、脱イオン水で洗い、水気を吸い取って乾かした。この結果は実験の全過程を通じて各々の緩衝液の種類で一貫したシグナルが存在する事を示してい

る。この事は本試薬の安定性とこれがエレクトロ化学ルミネセンスシグナルを発生する能力がある事を示している。

【0172】実施例67-Ru(II)-化合物III結合体の免疫学的反応性試験: 安定性に関する実験

本Ru(II)-化合物III結合体を実施例66で述べた条件で希釈し、インキュベートした。試料を3、4、及び5日目に採取し、室温にまで冷却し、Pandex, Inc., Mundelein, ILより入手したPandex Screen Machineを用いてParticle Concentration Fluorescent Immunoassay (PCFIA)により免疫学的反応性をテストした。このPCFIAは競合的アッセイ方式で行なった。このラテックス粒子(Pandex)をテオフィリン-BSAと結合させた。これらの粒子の一定量をRu(II)-化合物III結合体テスト溶液と抗テオフィリンモノクローナル抗体(腹水、Hyclone cat #E-3120 M, lot #RD200)の最終濃度まで、及び一定量のヤギ抗マウスIg-FITC結合体(Pandex, cat #33-02-1, lot #C01)と混合した。インキュベーションの後、この試料を加工し、Pandex Screen Machineで測定した。この結果は55°Cで5日間のインキュベーションの後に於いてさえ目に見えるほど活性は失われなかった事を示している。

【0173】実施例68-様々なルテニウム及びオスミウム化合物のエレクトロ化学ルミネセンス

様々なオスミウム及びルテニウム化合物を10mlの窒素でバージしたアセトニトリルに10mMの濃度で溶かした溶液として、電解質には1Mテトラブチルアンモニウムテトラフルオロホウ酸塩を用いて電気化学的に測定した。電解用電極はBioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, INより入手した白金ディスク電極である。白金線対向電極と1.0mmの銀線を参照電極として使用した。測定は走査速度100mV/secで-2.2Vから+2.2Vまで(vs SCE)走査する事により実施した。各々の電気化学的測定の後、飽和カロメル参照電極(SCE)と銀線との間の電圧差を測定した。従って報告される値はSCEに対する電圧に補正されている。エレクトロ化学ルミネセンス(ECL)の測定を0.1Mリン酸塩-クエン酸塩緩衝液(pH4.2)、25mMシュウ酸、及び1%Triton X-100を含む0.5mlの水溶液中で行なった。使用した電極システムは0.1mmの白金線でRadio Shack トランジスタソケット(#276-548)に接続された2つの白金ガーゼ(52ゲージ)電極から構成されていた。この電極は60mlのセルロースアセテートプラスチックの薄片の外側に取り付けられた。このプラ

スティックには直径1/4インチの穴があけられており、電解用と対向参照電極の間を容易に溶液が流れる事の出来るようになっている。ひとつの電極が電解用（これは光電子増倍管に近い）として機能し、もうひとつの電極が対向及び参照電極として機能するためにこれらの電極をポテンシostatに接続した。測定は走査速度50mV/secで1.5Vから2.5Vまで（バイアス電圧）走査して行なった。ECLの測定は化合物の与えられた濃度に於けるシグナル対ノイズの割合、即ち、又はシグナル対バックグラウンドの割合として報告する。

【0174】バックグラウンドはECL化合物の添加されていない緩衝液に対し観測されるルミネセンスカウント数と定義される。ルミネセンスの測定値は第1回目又は第2回目の線型走査の間に観測されるピーク光出力とした。エレクトロ化学ルミネセンス（ECL）及びサイクリックボルタンメトリーの測定の双方を各々の溶液について、Ursar Scientific Instruments, Oxford, Englandより入手したEG & G Model 273ポテンシostat又はビポテンシostatを用いて実施した。各々の*

*ECLの測定に於ける光子流はWilebad, West Germanyより入手したBerthold Biolumat LB 9500 luminometerでモニターした。この装置は0.5mlの測定溶液中に2~3個の電極システムが設置できる様に改変されている。電気化学的及びエレクトロ化学ルミネセントの測定はともにDelft, Hollandより入手したKipp & Zonen Model BD91X、Y、Y' レコーダーにより記録した。目的の化合物を3.0mlのECL溶液に溶かすか、或いはECL溶液に溶けない場合はアセトニトリルに溶かして、これを50ml用い、蛍光の測定を行なった。測定はPerkin-Elmer LS-5型蛍光分光光度計で行なった。最大励起波長を照射中に発光スペクトルが測定でき、逆に、最大発光波長をモニターする間に励起スペクトルを記録できるようにする為に、励起及び発光スペクトルを記録する前にこの溶液の励起及び発光スペクトルの予備走査を実施した。

【表17】

化合物	Box VS. SCE	Ered	蛍光発光 最大値の波長	ECL(S/N) ¹ 及び濃度
a) Ru(bipy) ₃	1.07V-1.52V		625 nm	1×10 ⁻⁴ M (2.5)
b) Ru(4,4'- CO ₂ -bipy) ₃	1.19V N.D.		628 nm	2×10 ⁻⁴ M (4.05)
c) Ru(4,4'-CO ₂ - Et-bipy) ₃	1.54V-0.89V		636 nm	1×10 ⁻⁴ M (2.01)
d) Ru(bipy) ₃ (C-8-theo- phylline C-4-bipy)	1.17V N.D.		624 nm	1×10 ⁻⁴ M (.97)
e) Os(bipy) ₃ (CO)(Py)	1.82V-0.99V		585 nm	1×10 ⁻⁴ M
f) Os(DPPene) (bpy)(bpyoxal)	1.60V N.D.		630 nm	6×10 ⁻⁴ M (10.8)

【0175】¹ (N/S) はシグナルを与えられた濃度に於ける化合物のECL出力（ルミネセンスのカウント数）として定義し、ノイズを化合物が溶解している緩衝液自体のルミネセンスのカウントと定義した際のシグナ

ル対ノイズの割合である。pH4.2で測定したその他の化合物のECLと異なり、化合物c)は生理学的なpH7に於いてもかなりのECLを示す。

a) トリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム2+

105

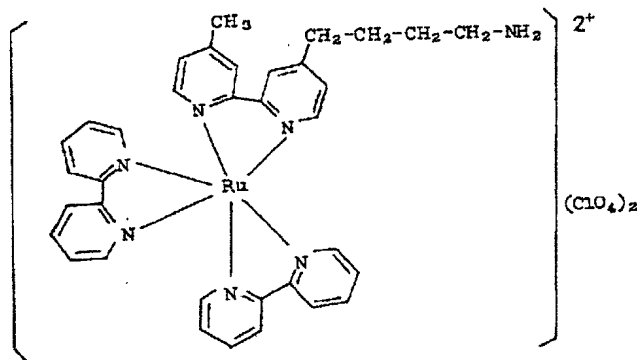
- b) トリス (4, 4'-カルボン酸-2, 2'-ビピリジン) ルテニウム 2+
- c) トリス (4, 4'-カルボエトキシ-2, 2'-ビピリジン) ルテニウム 2+
- d) 二塩化ビス (2, 2'-ビピリジン) [テオフィリン-8-酪酸-4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン)-4'-y1)-ブチル] アミド] ルテニウム (I I)
- e) ジヘキサフルオロリン酸 [ビス (2, 2'-ビピリジン) {モノカルボニル} ビリジ] オスミウム (I I)
- f) 二塩化 (2, 2'-ビピリジン [シス-ビス (1, 2-ジフェニルホスフィン) エチレン] {2-[3-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-イル) プロピル]-1, 3-ジオキソラン} オスミウム (I I)
- 【0176】実施例69-ビス (2, 2'-ビピリジン) [4-(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン) プ*

106

*チルアミン] ルテニウム (I I) 二過塩素酸

1. 29 g (2.48 mmol) の二塩化ビス (2, 2'-ビピリジン) ルテニウム (I I) 二水和物 (Strem) 及び 0.719 g (2.98 mmol) の 4-[4-(1-アミノブチル)] 4'-メチル-2, 2'-ビピリジン (実施例32で記載されている) を 50 ml の 50/50 エタノール/H₂O に懸濁し、アルゴン存在下で3時間還流した。この反応溶液を濃縮し、Sephadex C-25 のクロマトグラフィーによる分離を行ない、最初に蒸留水で、続いて 0.25 M NaCl で溶出した。最後に 0.4 M NaCl で溶出させた。本生成物を含むフラクションを約 100 ml まで濃縮し、この溶液が濁るまで過塩素酸を加えた。一晩冷蔵し、本生成物の赤橙色結晶 (1.215 g) を得た。元素分析の結果構造は以下の様に確認された:

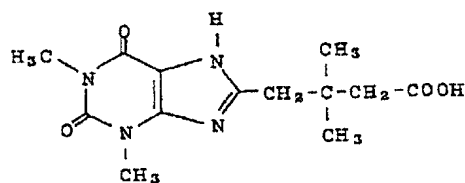
【化64】



【0177】実施例70-テオフィリン-8-(3, 3-ジメチル) 酪酸の製法

5, 6-ジアミノ, N¹, N³-ジメチルウラシル水和物 (10 g, 0.059 mmol) 及び 3, 3-ジメチルグルタミン酸無水物 (12.6 g, 8.85 × 10⁻² mol) を 100 ml N, N-ジメチルアニリンに溶かし、Dean-Stark トラップを使って還流した。この反応の内容物は加熱後可溶化し、橙赤色に変化した。4時間の還流後、1 ml の水がこのトラップ中に集まった。これはこの反応の完了を示している。この反応物を室温まで冷却した。この時、全体が固まっていた。この固体を fritted funnel 上で濾過し、色が淡黄色になるまで洗った。DMF から 2 回再結晶させた後、中間生成物であるラクタムの純粋な白色結晶 (融点 283.1-284.9°C) を得た。このラクタムを水の中で 8 時間煮沸した。冷却するとこの溶液から純粋な白色の結晶 (融点 218-220°C) が生じた。プロトン NMR と元素分析から以下の構造が確認された:

【化65】



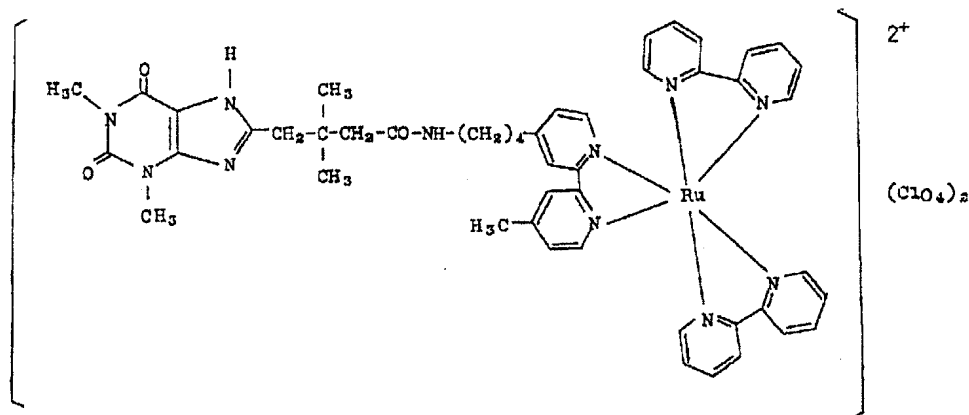
【0178】実施例71-ビス (2, 2'-ビピリジン) [テオフィリン-8-(3, 3-ジメチル酪酸-4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4'-yl)-ブチル] アミドルテニウム (I I I) 二過塩素酸

100 mg (0.34 mmol) のテオフィリン-8-(3, 3-ジメチル) 酪酸及び 0.325 g (0.34 mmol) の二過塩素酸ビス (2, 2'-ビピリジン) [4-(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン) ブチルアミド] ルテニウム (I I) を 0.351 g (1.7 mmol) のジシクロヘキシルカルボジイミドと共に 10 ml の無水ピリジンに溶かした。2日間攪拌して反応させた。多量のジシクロヘキシル尿素の沈殿を濾過により除去し、真空状態でこのピリジン溶液を濃縮した。この残留物をメタノールに溶かし、Sephadex

LH-20のクロマトグラフにかけた。目的とするフラクションを濃縮し、生成物をエーテルで沈殿させ、橙色の沈殿物を得た。元素分析とプロトンNMRの結果、構*

*造は以下のとおりである：

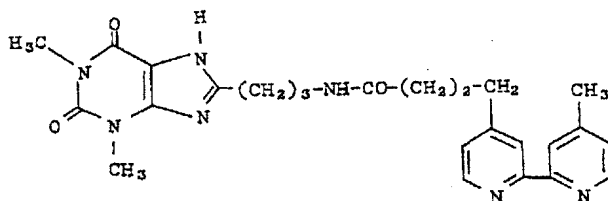
【化66】



【0179】実施例72-テオフィリン-8-プロピル(4-メチル-2,2'-ビピリジン-4'-ブチル)カルボン酸アミドの製法

61.8mg (1.55×10^{-4} mol) の8-(ガンマ-アミノプロピル)テオフィリンフタル酸ヒドラジド塩を1mlの水に溶かし、HClで酸性にした。沈殿させたフタル酸のヒドラジドを濾過により除去し、水溶性の濾液を蒸発乾固し、真空中で乾燥させて34.5mg (1.31×10^{-4} mol) のテオフィリン-8-プロピルアミン塩酸塩を得た。この物質を5mlの無水ピリジンに溶かし、36.9mg (1.44×10^{-4} mol) の4-(4-メチル-2,2'-ビピリジン-4'-yl) 酪酸と26.4mg (2.62×10^{-4} mol) のトリエチルアミンをこれに加えた。最後に29.7mg (1.44×10^{-4} mol) のジシクロヘキシルカルボジイミドをこの溶液に加えた。得られた濁った溶液を一晩攪拌した。沈殿した塩とジシクロヘキシル尿素を濾過により除去し、この溶液を蒸発乾固させて白色固体を得、これを溶出剤として5%のメタノールを含むジクロロメタンを用いたアルミナのクロマトグラフにかけた。生成物は白色粉末(融点215°-216.5°C)として44.2mg (71%) 得られた。プロトンNMR及び元素分析により以下の構造が確かめられた：

【化67】



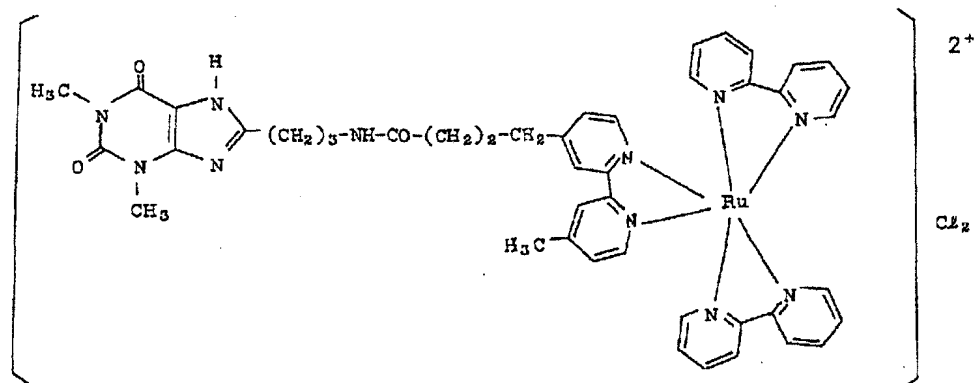
【0180】実施例73-二塩化ビス-(2,2'-ビピリジン) [テオフィリン-8-プロピル(4-メチル-2,2'-ビピリジン-4'-ブチル)カルボンアミド] ルテニウム(II)の製法

100mg (2.06×10^{-4} mol) の二塩化ビス(2,2'-ビピリジン) ルテニウム (Strem) 及び108mg (2.27×10^{-4} mol) のテオフィリン-8-プロピル(4-メチル-2,2'-ビピリジン-4'-ブチル)カルボンイミドをアルゴンで脱気した50%エタノールに加えた。この溶液を加熱還流した。得られたチェリーレッドの溶液を室温で高真空で濃縮した。この残留物を溶出剤にメタノールを用いてSe

phadex LH-20 (75cm×19mm I.D.) でクロマトグラフした。生成物のバンドを分離し、溶媒をとばして、無水エーテル中に入れ沈殿させた。本生成物の収量は156mg (75%) であった。元素分析の結果、本生成物中には4モルのメタノールが存在している事が示された。

分析結果：計算上；C, 54.09；H, 5.65；N, 14.16；O, 10.29；Cl, 6.52；実測；C, 53.30；H, 5.22；N, 14.56；O, 10.63及びCl, 6.95。

【化68】

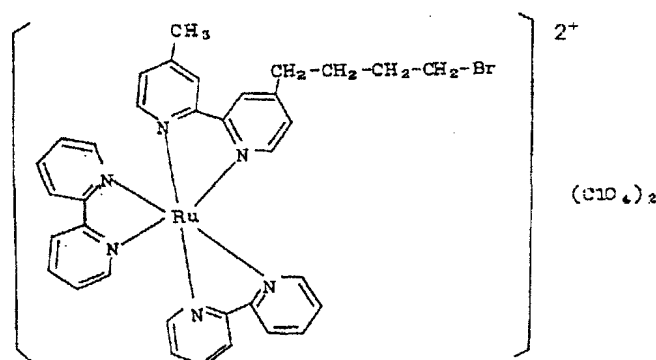


【0181】実施例74-二過塩素酸ビス(2, 2'-ビピリジン) [1-ブromo-4-(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-yl)ブタン] ルテニウム (I I) の製法

実施例31で調製された配位子1-ブromo-4-(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-yl)ブタンを 0.29g 及び二塩化ビス(2, 2'-ビピリジン) ルテニウム (I I) を 0.32g, 60ml の 1:1 v/v エタノール/水の入ったフラスコに入れた。この溶液を窒素で15分間脱気した。反応は窒素中で3.5時間加熱還流して行なった。NaClO₄の飽和水溶液を冷却したこの赤色溶液に加えた。真空中で溶媒を除き、深*

* 赤色の残留物を溶離剤としてアセトニトリル/トルエン 1:1 v/v を用いたアルミナのカラムクロマト (20 cm x 2.5 cm, Merck, 天然活性3) にかけて。本生成物はカラムより暗赤色のバンド (バンド# 2) として溶出した。目的とするフラクションを集め、約10ml のジクロロメタンに再び溶かし、無水エチルエーテルより沈殿させ、最後に真空中で乾燥させて320mg (53%) の収量の本生成物を得た。本生成物の構造は元素分析とスペクトル特性により確認され、以下に示す。

【化69】



【0182】実施例75-二過塩素酸ビス(2, 2'-ビピリジン) [テオフィリン-9-[4-(4-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-yl)ブタン] ルテニウム (I I) の製法

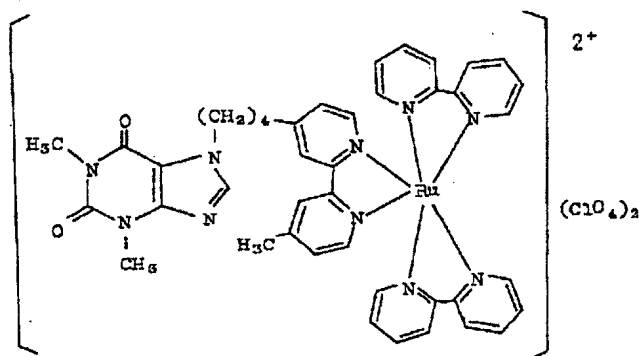
テオフィリンの銀塩はテオフィリンのアンモニア溶液 (25ml conc. NH₄OH 及び 75ml の水) に 2.168g と硝酸銀のアンモニア溶液 (10ml conc. NH₄OH 及び 30ml H₂O 中に 2.006g) を共に混合し、暗い状態で反応させる事により調製した。この2つの溶液を混合させた直後、白色の生成物が出現した。生成物の沈殿が完了したら、この沈殿物を 60ml medium glass fr

it 上で濾過する事により集めた。この沈殿物を希アンモニア水で洗浄し、真空中で乾燥させた。テオフィリンの銀塩の構造は元素分析により確認した。41mg のテオフィリンの銀塩及び 122mg の二過塩素酸ビス(2, 2'-ビピリジン) [1-ブromo-4-(4'-メチル-2, 2'-ビピリジン-4-yl)ブタン] ルテニウム (I I) を 15ml の無水ジメチルホルムアミド (DMF) に溶かし、反応は暗条件で行なった。得られた赤色溶液はアルゴンで脱気し、24時間加熱還流し、次に室温までアルゴン存在下で冷却した。この溶液の冷却は氷点まで続け、次にこの黒色の銀金属懸濁液を濾過し、5ml のアセトンで洗浄した。赤色の濾液を

0.2 gの過塩素酸ルテニウムで処理し、 LiClO_4 を溶解した後この溶液を真空下で蒸発乾固させ、赤色の残留物を暗条件で一晩真空中に置き乾燥させた。この試料を3-5 mlのメタノールに溶かし、0.25 gの無水 LiClO_4 を加え、溶かした。得られた溶液は溶出剤にメタノールを使用したSephadex LH-20のカラム(75 cm×19 cm i. d.)にかけ *

*た。主生成物はフラクション#2(暗赤色バンド)として溶出した。フラクション#2を濃縮し、メタノールに再び溶かし、エチルエーテルに注いで沈殿させた。この生成物を真空下で乾燥させ、80 mg(50%収率)の物質を得た。この構造は元素分析と赤外線及び発光スペクトルで確認した。

【化70】



【0183】引用文献

1. Weber, S. G., et al., Photoelectroanalytical Chemistry: Possible Interference in Serum and Selective Detection of Tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium(II) in the Presence of Interferents, Clinical Chemistry, 29, 1665-1672 (1983).

2. Rubinstein, I. and Bard, A. J., Electrogenerated Chemiluminescence. 37. Aqueous ECL Systems Based On Ru(2, 2'-bipyridine) 3^{2+} and Oxalate or Organic Acids, J. Am. Chem. Soc., 103, 512-516 (1981).

3. White, H. S. and Bard, A. J., Electrogenerated Chemiluminescence. 41. Electrogenerated Chemiluminescence and Chemiluminescence of the Ru(2, 2'-bipyridine) 3^{2+} - $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ System in Acetonitrile Water Solutions, J. Am. Chem. Soc., 104, 6891 (1982).

4. Curtis, et al., Chemiluminescence; A New Method for Detecting Fluorescent Compounds Separated By T

20 hin Layer Chromatography, J. Chromatography, 134, 343-350 (1977).

5. Sprintschnik, G., et al., Preparation and Photochemical Reactivity of Surfactant Ruthenium(II) Complexes in Monolayer Assemblies and at Water-Solid Interface, J. Am. Chem. Soc., 99, 4947-4954 (1977).

6. Minnich, S. A., et al., Enzyme Immunoassay for Detection of Salmonellae in Foods, Appl. and Environ. Micro., 43, 1124-1127 (1982).

【0184】7. Thomason, B. M., Current Status of Immunofluorescent Methodology for Salmonellae, J. Food Prot., 44, 381-384 (1981).

8. Mattingly, J. A., An Enzyme Immunoassay for the Detection of All Salmonella Using a Combination of a Myeloma Protein and a Hybridoma Antibody, J. Immunol. Meth., 73, 147-156 (1984).

9. Thompson, N. E. et al., Detection of Staphylococcal enterotoxins by enzyme-li

nked immunosorbent assays and radio-immunoassays: Comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems, Appl. and Environ. Micro., submitted publication.

10. American public Health Association, Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. American Public Health Association, Inc., New York (1980).

11. American Public Health Association, Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D. C. (1976).

12. Clark, H. F., Geldreich, E. E., Lester, H. L., and Kabler, P. W., The membrane filter in sanitary microbiology, Public Health Rep. 66: 951-957 (1951).

[0185] 13. Feng, P., and Hartman, P. A., Fluorogenic assays for immediate confirmation of Escherichia coli, Appl. Environ. Microbiol. 43:1320-1329 (1982).

14. Geldreich, E. E., Standard method Revisions (16th edition) for Conventional coliform Procedures. In: New developments in drinking water microbiology workshop, 85th Annual Meeting of the American Society for Microbiology (1985).

15. Hussong, D., Colwell, R. R., and Weiner R. M., Rate of occurrence of false-positive results from total coliforms most-probable-number analysis of shellfish and estuaries. Appl. Environ. Microbiol. 40:981-983

(1980).

16. Hussong, D., Demare, J. M., Weiner, R. M., and Colwell, R. R., Bacteria associated with false-positive most-probable-number coliform test results for Shellfish and estuaries, Appl. Environ. Microbiol. 41:35-45 (1981).

17. Lin, S., Evaluation of coliform tests for chlorinated secondary effluents, J. Water Pollut. Control Fed. 45:498-506 (1973).

[0186] 18. McKee, J. E., McLaughlin, R. T. and Lesgourges, P., Application of molecular filter techniques to the bacterial assay of sewage III. Effects of physical and chemical disinfection, Sewage Ind. Waste 30:245-252 (1958).

19. Mead, J. A. R., Smith, J. N., and Williams, R. T., The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of beta-glucuronidase, Biochem. J. 61:569-574 (1954).

20. Olson, B. H., Enhanced accuracy of coliform testing in seawater by modification of the most-probable-number method. Appl. Environ. Microbiol. 36:438-444 (1978).

21. Presnell, M. W., Evaluation of membrane filter methods for enumerating coliforms and fecal coliforms in estuarine waters, Proc. National Shellfish Sanitation Workshop. 1974:127-131 (1974).

[0187] 22. Presswood, W. G., and Strong, D. K., Modification

ion of mFC medium by eliminating rosolic acid, Appl. Environ. Microbiol. 36:90-94 (1978)。

23. Warr, G. W., and Marchalonis, J. J., Purification of Antibodies. In: Antibody as a Tool, J. Wiley and Sons, NY, PP. 59-96 (1982)。

24. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, P. 150-160, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)。

【図面の簡単な説明】

【図1】溶液中の一種の抗原の濃度を測定するための均質系イムノアッセイ用に用いられるエレクトロ化学ルミネセンス測定法について表わしたものである。

【図2】均質系ECLテオフィリン試験の結果をグラフに表わしたものである。

【図3】各種血清における均質系テオフィリン試験の結果をグラフに表わしたものである。

【図4A】ECLテオフィリン試験の結果を蛍光偏光テオフィリン試験の結果と比較しグラフに表わしたもので

ある。

【図4B】ECLテオフィリン試験の結果を蛍光偏光テオフィリン試験の結果と比較しグラフに表わしたものである。

【図4C】ECLテオフィリン試験の結果を蛍光偏光テオフィリン試験の結果と比較しグラフに表わしたものである。

【図4D】ECLテオフィリン試験の結果を蛍光偏光テオフィリン試験の結果と比較しグラフに表わしたものである。

【図5】ECLテオフィリン試験の結果を高速液体クロマトグラフィー試験の結果と比較しグラフに表わしたものである。

【図6】ECLジゴキシニムノアッセイにおいて產生されたECL信号の調整をグラフに表わしたものである。

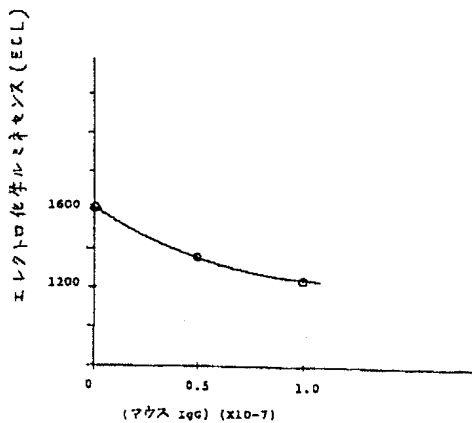
【図7】ECLジゴキシニムノアッセイの結果をグラフに表わしたものである。

【図8】MBI38-化合物Iの各濃度において產生されたECL信号をグラフに表わしたものである。

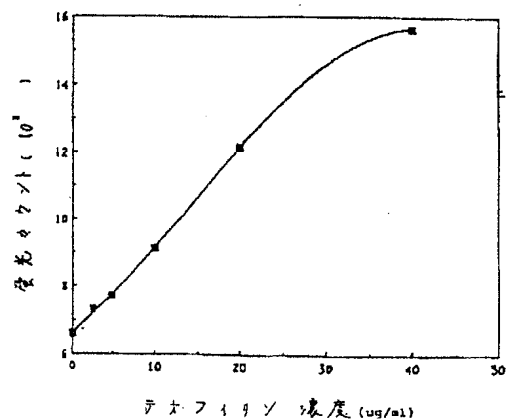
【図9】X線写真を示すものであり、MBI38-化合物Iのハイブリッド形成/感受性試験の結果を示したものである。

【図10】X線写真を示すものであり、MBI38-化合物Iの特異性試験の結果を示したものである。

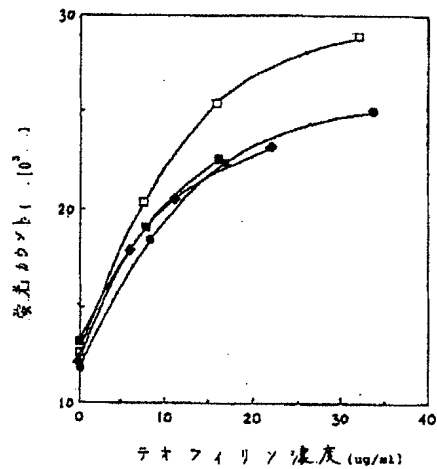
【図1】



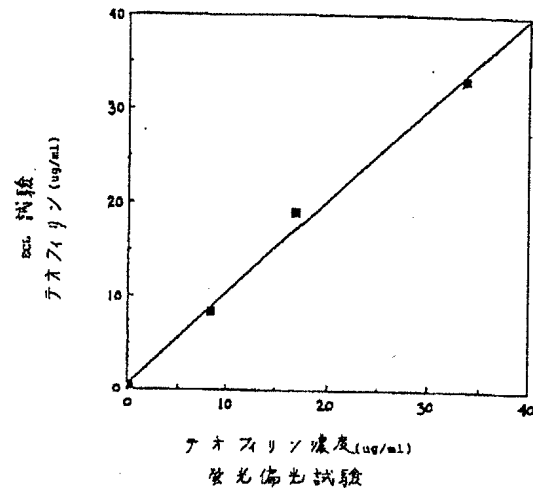
【図2】



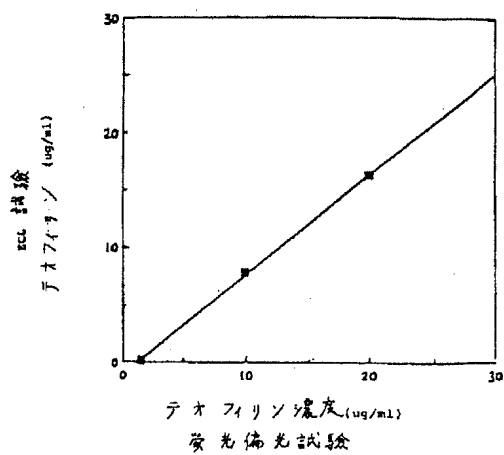
【図3】



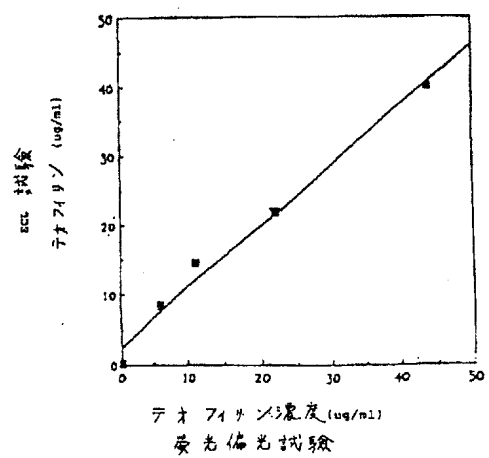
【図4 A】



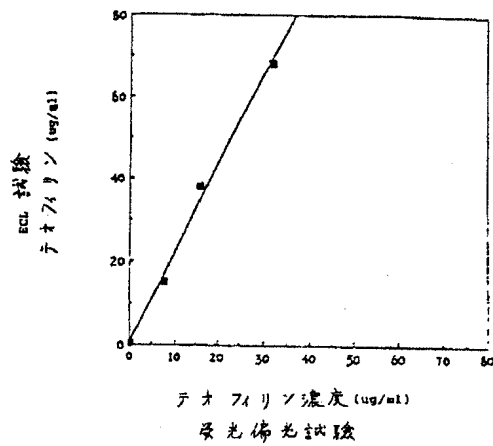
【図4 B】



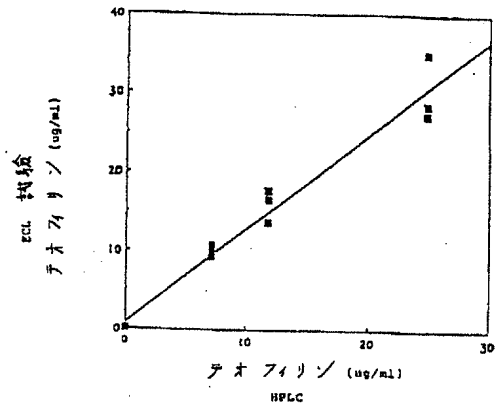
【図4 C】



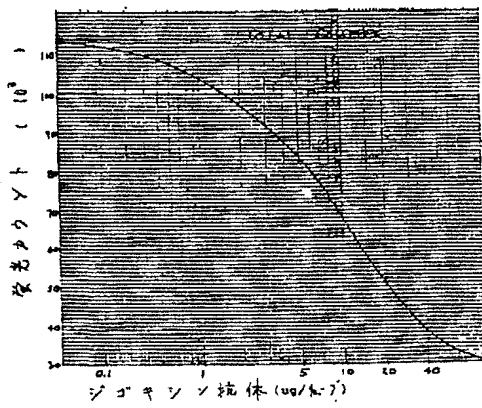
【図4D】



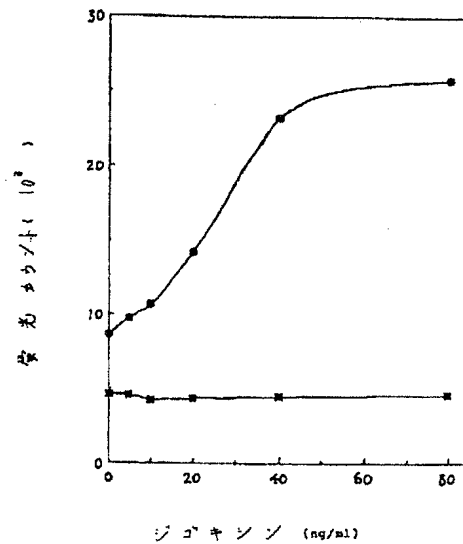
【図5】



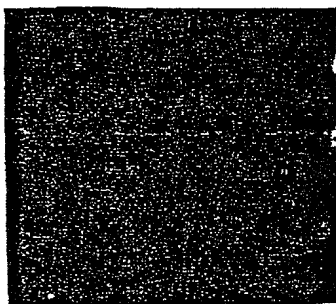
【図6】



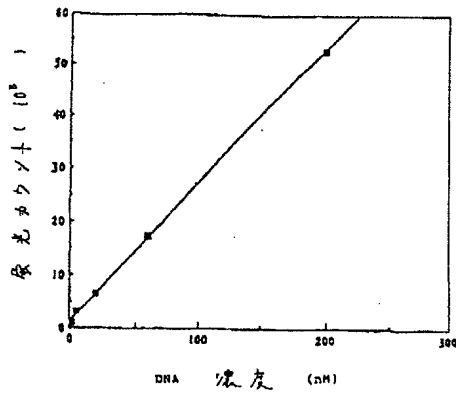
【図7】



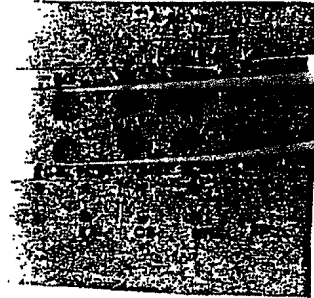
【図9】



【図8】



【図10】



【手続補正書】

【提出日】平成7年6月2日

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9

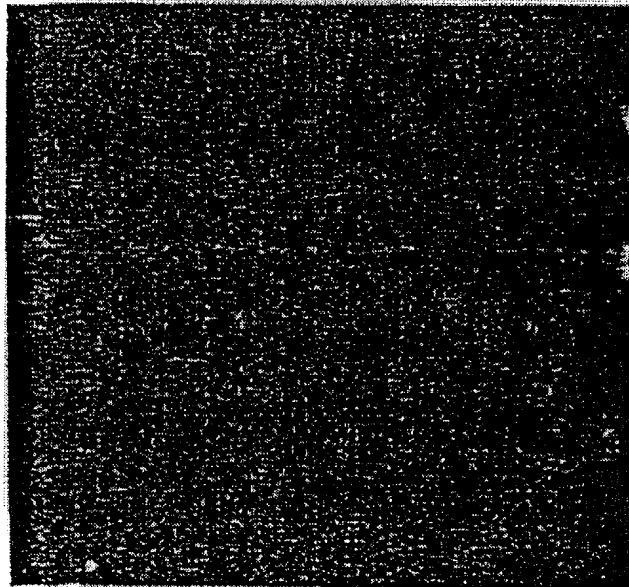
* 【補正方法】変更

【補正内容】

【図9】

*

図面代用写真



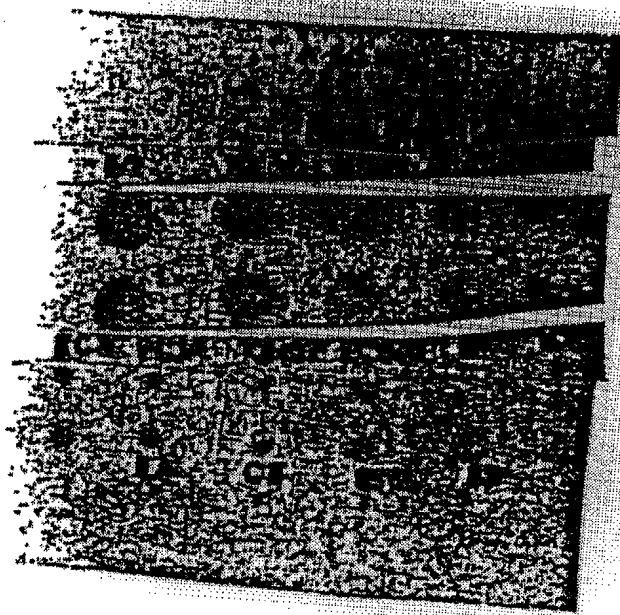
【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図10

【補正方法】変更

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int.Cl.6

C 0 7 D 405/06

C 0 7 F 15/00

C 0 9 K 11/06

G 0 1 N 33/533

// C 0 7 K 16/00

識別記号

2 1 3

庁内整理番号

A 9155-4H

9280-4H

8318-4H

F I

技術表示箇所

(72)発明者 ボウエル, マイケル ジェイ.
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州
 ゲイサースバーグ, ウォー アドミラル
 ウエイ 5

(72)発明者 ミード, ポール エイ.
 アメリカ合衆国 21776 メリーランド州
 ニューウインザー, バッファロウ ロード
 3713

(72)発明者 フェング, ピーター
 アメリカ合衆国 20852 メリーランド州
 ロックビル, ロリンズ アベニュー 245

(72)発明者 デラ シアナ レオポルド
 アメリカ合衆国 20851 メリーランド州
 ロックビル, ハルピン プレース 5511

(72)発明者 ドレシク, ウォルター ジェイ.
 アメリカ合衆国 20851 メリーランド州
 ロックビル, クルックストン レーン
 12905

(72)発明者 プーニアン, モヒンダー エス.
 アメリカ合衆国 20879 メリーランド州
 ゲイサースバーグ, ハイ ティンバー コ
 ート 224